

# VACUNA INACTIVADA DE ENCEFALITIS EQUINA DEL ESTE, CEPAS SURAMERICANAS.

## II. EVALUACIÓN EN ASNOS EN CAUTIVERIO

### Inactivated Vaccine of Eastern Equine Encephalitis Virus South American Strains. II. Evaluation in Donkeys in Captivity

Julieta de Siger<sup>1</sup>, Elvira Pulgar<sup>1</sup>, Gladys Medina-Gutiérrez<sup>1</sup>, Mario Pérez-Barrientos<sup>2</sup>, Irineo Matheus<sup>1</sup>  
y Omar Colmenares<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sanidad Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay, estado Aragua, Venezuela.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

<sup>3</sup>Departamento de Producción Animal, Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Rómulo Gallegos.  
San Juan de Los Morros, estado Guárico, Venezuela. E-mail: jcsiger@cantv.net.

#### RESUMEN

Conocer el efecto protector (antigenicidad y seguridad) de dos vacunas de encefalitis equina del este (EEE) cepas La Trinidad y Tucacas evaluadas en asnos. Dos lotes de vacuna preparadas con cepas venezolanas fueron probados en asnos libres de anticuerpos a los virus de EEV y EEE, cada lote fue probado en nueve asnos (*Equus asinus*) (seis vacunados y tres testigos). Se realizaron tomas de temperatura rectal dos veces al día durante el período de observación, desde prevacunación hasta 10 días después del desafío, observación de signos clínicos, desarrollo de anticuerpos EEE y aislamiento viral 10 días después del desafío. Ninguno de los asnos vacunados con la cepa Tucacas mostró enfermedad ni aislamiento de virus antes ni después del desafío con 631.000 dosis letal cincuenta por ciento en ratón lactante intracerebral por mL (DL<sub>50</sub>%RLIC/mL). Anticuerpos neutralizantes al virus EEE fueron demostrados en muestras séricas colectadas 21 y 28 días después de vacunados. Después de la exposición al virus infeccioso (EVI), dos de los controles mostraron signos de enfermedad y de los tres testigos se obtuvo aislamiento viral. La vacuna elaborada con la cepa La Trinidad producida en embriones de pollo y evaluada en asnos no fue satisfactoria; no se encontraron diferencias de temperatura estadísticamente significativas ( $P > 0,1$ ), entre vacunados y testigos, ni antes ni después del desafío con 35.280 dosis. Después de la EVI, se aisló virus en tres de seis vacunados (50%) y en dos de tres testigos (66,7%). Los resultados de este estudio mostraron la

efectividad de la vacuna preparada con la cepa Tucacas, producida en células Vero e inactivada con formol (0,05%/24 horas/37°C).

**Palabras clave:** Encefalitis equina del este, cepas suramericanas, vacunas inactivadas, asnos, cepas venezolanas, formaldehído.

#### ABSTRACT

Evaluate immunity and safety from two eastern equine encephalitis (EEE) vaccine's strains (La Trinidad and Tucacas) in donkeys. Two batches of vaccine, prepared with Venezuelan strains were tested in donkeys in captivity in an insect secure virus safe isolation room. Each one were tested in nine donkeys (*Equus asinus*) (six vaccinated and three controls). Rectal temperature were taken twice daily during the observation period, from prevaccination until at least ten days post challenge, observations of clinical signs, antibodies response to EEE in samples taken 21 and 28 days post vaccination and EEE virus isolation 10 days post challenge. With Tucacas-Vero cells (VC) vaccine, none vaccinated donkeys showed signs of illness or virus isolation before or after challenge with 631,000 SMICLD50%. Neutralizing antibodies were demonstrated in samples collected by 21 and 28 day postvaccination. After challenge, two of the control donkeys showed signs of illness, and virus isolation were positive in all of them. La Trinidad whole Chicken Embryo (WCE) vaccine evaluated in donkeys was not satisfactory, there were not differences ( $P > 0.1$ ) between vaccinated and control donkeys; they did not show signs

of illness, development of antibodies, before or after challenge with 35.280 infectious virus were negative. After challenge 50% of vaccinated and 66.7% control donkeys were positive for virus isolations. The results of this study show the effectiveness of the vaccine prepared with Tucacas strain growth in VC and inactivated with (formol/0,05%/24 hours/37°C).

**Key words:** Eastern Equine Encephalitis, South American strains, inactivated vaccines, donkeys, Venezuelan strains, formaldehyde.

## INTRODUCCIÓN

El virus de la encefalitis equina del este (EEE) pertenece a la familia *Togaviridae*, género *alfavirus* [7]. Pruebas serológicas de cinética de inhibición de la hemoaglutinación permitieron reconocerle dos variedades antigénicas; la conformada por los aislamientos de Norteamérica y el Caribe, y las Suramericanas, integrada por las cepas aisladas de Centro y Suramérica mostrando inclusive ligeras diferencias entre las variedades Suramericanas [7, 8]. Hoy se conoce que existen tres grupos antigénicos dentro de las variedades Suramericanas: a) El grupo de la Amazonia Peruana: aislamientos del Valle del Amazonas del Perú y Brasil. b) Aislamiento del Este de Brasil, 1985, c) Es el grupo más amplio y representa el resto de los aislamientos del Centro y Sur América hasta Argentina [5, 29].

En Venezuela, el virus fue aislado por primera vez en el estado Zulia en su ciclo silvestre de hámsters centinelas, en 1975 [28], y epizooticamente de equinos en 1976 [22]. Los equinos pertenecientes a zonas a riesgo, donde se detecte actividad epizootica, al igual que los equinos de deporte (por su frecuente movilización y alto valor económico) deben ser protegidos mediante vacunación. Las cepas actuantes en Venezuela pertenecen al subtipo suramericano (SSA) [5, 27, 29]; las vacunas de EEE autorizadas son monovalentes inactivadas de EEE o bivalentes de encefalitis equina Venezolana (EEV) y EEE, pero todas han sido elaboradas con cepas del subtipo norteamericano (SNA) del virus EEE.

Existen diferencias antigénicas y moleculares, entre las cepas de las variedades norteamericanas y de las variedades suramericanas [5, 29], éstas últimas son más diversificadas, heterogéneas y correlacionan antigenicidad con distribución geográfica [14]. Las cepas norteamericanas están asociadas a una alta mortalidad en equinos y humanos y otras especies, (aves, suinos, etc.); las cepas Suramericanas causan enfermedad más moderada en equinos y prácticamente no afectan humanos [14, 21, 29].

Al relacionar la respuesta inmune de equinos y/o humanos vacunados con biológicos elaborados con cepas norteamericanas muestran buena reactividad en el análisis con las cepas homólogas [6, 11, 20, 25], pero mucho menor o ausente al enfrentarlas con las cepas Suramericanas. La amenaza de brotes esporádicos de EEE en distintas localidades del país,

en poblaciones susceptibles de équidos y humanos, señalan la necesidad de producir un biológico eficiente para la inmunización de los equinos que por salud o el valor económico de ellos, requieren ser protegidos mediante la vacunación.

La ausencia de vacunas elaboradas con cepas autóctonas u otras vacunas que protejan a las cepas de virus EEE epizootico actuantes en el país motivaron la evaluación en asnos, de dos vacunas previamente analizadas en animales de laboratorio, ellas fueron: 1.- Vacuna elaborada con la cepa La Trinidad, producida en embrión de pollo (EP). 2.- Vacuna elaborada con la cepa Tucacas, producida en células Vero (CV.) Los óptimos resultados obtenidos en animales de laboratorio en la producción de vacunas inactivadas de EEE, cepas La Trinidad y Tucacas, elaboradas en EP y CV respectivamente [24], señalan la necesidad de evaluar la vacuna en asnos en cautiverio, antes de la evaluación de campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron evaluados dos lotes de vacuna inactivada en asnos (*Equus asinus*) alojados en galpones antimosquito en cautiverio: Vacuna inactivada La Trinidad, producida en EP y Vacuna Tucacas, producida en CV.

### Animales

Asnos procedentes de la península de Araya, estado Sucre, seleccionados al azar dentro de la población disponible en el Instituto de Investigaciones Veterinarias (IIV). Todos fueron evaluados y confirmados de estar libres de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (AcIHA) y anticuerpos neutralizantes (AcN) a los virus EEV y EEE. Se utilizaron nueve asnos (seis vacunados y tres testigos) para cada vacuna evaluada, en total 18 asnos.

### Vacunas

Las características de las vacunas a evaluar en asnos fueron: 1.- Vacuna elaborada con cepa La Trinidad replicada en EP con un título de  $10^{10,6}$  dosis letal cincuenta por ciento en ratón lactante intracerebral por mL ( $DL_{50\%}RLIC/mL$ ), pase dos, en cerebro de ratón lactante y cinco en embrión (CRL2E5) inactivada por formol, 0,4%/72 horas/37°C. 2.- Vacuna elaborada con la cepa Tucacas producida en CV con un título de  $10^{8,9}$   $DL_{50\%}RLIC/mL$ , pase cinco, en cerebro de ratón lactante, intraperitoneal uno, Vero uno (CRL<sub>5</sub>IP<sub>1</sub>V<sub>1</sub>) inactivada con formol al 0,05%/24 horas/37°C.

**Vacuna Tucacas-CV evaluación en asnos.** Para estudiar esta vacuna se utilizaron 9 animales cuyas edades comprendían, entre 1 mes y 13 años, estimados según la erupción y desgaste dental [1]. Dos de ellos tenían 1 y 2 meses y fueron distribuidos respectivamente, en los grupos vacunados y testigo, a fin de igualar la influencia de los animales más jóvenes en el desarrollo del experimento. Antes de los ensayos, los as-

nos permanecieron un tiempo en los corrales del IIV. Los criterios para la evaluación de la vacuna fueron: estado de salud, ausencia de anticuerpos a los virus EEV y EEE previo al ensayo, temperatura rectal dos veces al día, durante 10 días posterior al desafío, signos clínicos, desarrollo de anticuerpos postvacunación y conocer la fracción preventiva [9].

La vacunación de los asnos fue realizada a razón de 1 mL intramuscular (IM), aplicada en doble dosis los días 0 y 14 y desafiado 28 días después de aplicada la segunda dosis. Los asnos testigos y vacunados fueron expuestos con una carga viral de 631.000 DL 50% RLIC/mL de la cepa homóloga, en su quinto pase en cerebro de ratón lactante y ratón adulto intraperitoneal (CRL5 RAIP) por la vía subcutánea (SC). A todos los asnos se les tomó la temperatura rectal en los siguientes momentos: durante 10 días previos a la vacunación (M1), antes de la aplicación de la primera dosis (M2), después de la segunda dosis (M3) y posterior al desafío (M4). También se les tomaron muestras sanguíneas para la detección de anticuerpos los días de ingreso al galpón, el día de la aplicación de la primera dosis de vacuna, días 10, 14, 21 y 28 antes del desafío, así como los días 10, 17 y 30 posterior al mismo. Se consideraron controles para la detección de virus los primeros 10 días después de la exposición. Se hicieron controles de esterilidad en tioglicolato, sabouraud y otros medios líquidos y sólidos, incubados a temperatura ambiente y a 37°C, especialmente para la semilla y la vacuna terminada a ser evaluada en asnos.

**Vacuna La Trinidad-EP evaluación en asnos.** Los criterios de evaluación de esta vacuna fueron similares a los de la cepa Tucacas de EEE. La edad de los animales estuvo comprendida entre uno y siete años. El período de prevacunación fue de 10 días, aplicando 1 mL IM profundo en los días cero y siete y EVI el día 21 (14 días después de la segunda dosis vacunal) todos los asnos recibieron 35.280 DL50%RLIC/mL de la cepa homóloga en su segundo pase en cerebro de ratón lactante (CRL), aplicado por la vía SC.

### Pruebas serológicas

Los valores de pre y postvacunación fueron probados mediante las técnicas de Inhibición de Hemoaglutinación (IHA) y Seroneutralización (SN). En la prueba de IHA fue usada la microadaptación del método de Clarke y Casals [10]. Los antígenos EEV y EEE fueron tratados con sacarosa-acetona, los sueros fueron extraídos con acetona y adsorbidos con glóbulos rojos de ganso (*Anser cinereus*). Títulos iguales o mayores a 1:20 eran considerados positivos a la presencia de AclHA en pruebas entre 4 y 8 unidades hemoaglutinantes. La prueba de neutralización fue realizada en ratones blancos suizos (*Mus musculus*) entre 21 y 23 días de nacidos como fue descrito por Parra y col. [16].

### Fracción preventiva (FP)

Calculada como fue descrita por el Centro para Biológicos Veterinarios [9], es el complemento de la fracción de riesgo (FR). FR es igual al número de vacunados afectados sobre

el número de vacunados totales dividido entre el número de controles afectados sobre el número de controles totales  $FR = VA/VT$  entre  $CA/CT$ , donde  $FP = 1 - FR$

### Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza de las temperaturas de los asnos en los diferentes momentos y tratamientos. La vacuna La Trinidad en EP mediante la prueba T de Student y la vacuna Tucacas mediante la prueba F del programa Statgraphics Plus for Windows. La diferencia entre grupos fue considerada estadísticamente significativa cuando los valores de la varianza resultaron por lo menos  $P < 0,1$ .

### Detección de virus

Fue realizada en muestras de sueros tomados durante diez días continuos después del desafío. Fueron inoculados en ratón lactante intracerebral más subcutáneo (RLIC+SC) con 25  $\mu$ L/vía. Los animales se observaban durante 10 días. Ratones enfermos o muertos eran identificados por fijación de complemento (FC).

### Fijación de complemento

Se utilizó el micrométodo en pruebas 100% de hemólisis. Diluciones de antígenos crudos suspensión de cerebro de ratón lactante (CRL) en solución salina fisiológica mezclado con diluciones de líquido ascítico inmune de EEE y EEV más dos unidades de complemento, incubación durante la noche a 4°C, el día siguiente se le agrega sistema hemolítico, e incubación a 37°C durante una hora.

### Titulación de virus

Titulaciones simultáneas a las pruebas de desafío en asnos y seroneutralizaciones fueron realizadas en ratones blancos suizos y calculados como ha sido descrito [16, 17].

### Seguridad biológica

Para el control y evaluación de escape de virus del galpón experimental se acondicionaron los galpones con protección de doble tela metálica, doble puerta de entrada (Trampa), fumigación del área así como de los asnos con insecticida que contenía: tetramethrin, diclorvos y butóxido de piperonilo. Adicionalmente se colocaron hámsters (*Mesocricetus auratus*) centinelas en el exterior del galpón donde se llevaban a cabo los ensayos y en un corral a 25 m de distancia de los hámsters centinelas y del galpón de los asnos, estaban burros libres de anticuerpos para encefalitis equina, los cuales también servían como centinelas.

## RESULTADOS

La evaluación de los asnos que ingresaron al estudio mostró en ambos casos que los mismos estaban clínicamente

en buen estado de salud y que carecían de anticuerpos a los virus de EEV y EEE, el análisis estadístico reveló que vacunados y testigos pertenecían al mismo universo.

### Vacuna EEE-La Trinidad producida en embriones de pollo

Los resultados obtenidos en los nueve asnos (6 vacunados y tres testigos) libres de anticuerpos a los virus EEE y EEV y en buen estado de salud, no mostraron diferencias entre vacunados y testigos, ( $P > 0,1$ ), ni aún después del reto con 35.280 DL50%RLIC/mL. Ningún asno mostró signos de enfermedad ni alza térmica. Los promedios de temperatura a.m. y p.m., durante los 10 días previos a la vacunación (M1), siete días después de la primera dosis (M2), 10 días después de la segunda dosis (M3) y 10 días después del desafío (M4) se ubicaron dentro de los valores normales (37,2-37,9°C) TABLA I. El análisis estadístico del promedio de las temperaturas mediante T Student no mostró diferencias significativas ( $P > 0,1$ ) entre los vacunados, entre los testigos, ni entre vacunados y testigos. La detección del virus después de la EVI resultó positiva en 50% de los asnos vacunados, aislándose virus de EEE en los días 5 y 6; así como también, se aisló virus de EEE en dos de los asnos testigos los días 4 y 6. Considerando aislamiento viral como factor a riesgo en vacunados y testigos tenemos que  $FR = 3/6$  entre  $2/3 = 0,75$  y la  $FP = 1 - FR = 1 - 0,75 = 0,25$ ; en consecuencia, la fracción protegida resultó igual a 0,25 valor no satisfactorio. No se detectaron AclHA ni SN en ninguno de los asnos vacunados ni testigos, a excepción del suero del día 10 después de la exposición de un asno testigo de 7 años que resultó positivo 1:20 AclHA frente al antígeno EEE.

La similitud de los parámetros evaluados en vacunados y testigos no permiten calificar la vacuna como aceptable. En-

tre los factores que pueden haber influido en estos resultados, se encuentran: 1.- Intervalo entre primera y segunda dosis vacunal (siete días) 2.- intervalo entre segunda dosis vacunal y desafío (14 días), 3.- Vía de aplicación de la vacuna, 4.- Tratamiento de inactivación del virus vacunal, 5.- Sensibilidad de las pruebas, 6.- Factores humanos: diluciones, aplicación de la vacuna. Estos serán considerados en la discusión.

### Vacuna EEE Tucacas elaborada en células Vero

Nueve asnos (seis vacunados y tres testigos) libres de AclHA y AcN a los virus EEE y EEV; los resultados obtenidos fueron los siguientes: desde el inicio del experimento hasta el momento del desafío, todos los asnos permanecieron en buen estado de salud. Posteriormente, todos los vacunados y uno de los testigos permanecieron en buen estado de salud, lo cual concuerda con la expresión clínica moderada de las cepas del SSA. Dos de los tres testigos mostraron signos de enfermedad, el más joven (1 mes de edad) presentó fiebre con temperatura hasta de 39,8°C, rechinar de dientes, decaimiento, secreciones, lagrimeo durante dos días y el testigo de tres años mostró signos más leves durante un día, decaimiento, anorexia, lagrimeo. La TABLA II muestra los resultados de las pruebas de aislamiento viral y desarrollo de AclHA y AcN. No hubo aislamiento viral en los vacunados. Se obtuvo aislamiento viral en los tres testigos, uno de ellos durante un día y en los otros dos durante tres días; de ellos, el más joven con viremia consecutiva durante los días uno a tres, fue el que mostró signos clínicos más intensos; el otro asno mostró signos de enfermedad más leves, se le detectó viremia durante un día. Al testigo que no expresó signos clínicos de enfermedad (asno # 288), se le detectó virus los días tres, cuatro y siete, patrón bifásico en viremia sin las otras características descritas por Fenner y col. [12] en base al trabajo de R. Kissling con cepas SNA. El desarrollo de AcN re-

TABLA I

### PROMEDIOS DE TEMPERATURA a.m. Y p.m. EN ASNOS EN LOS DIFERENTES MOMENTOS DEL ENSAYO Y LA VIREMIA DESPUÉS DEL DESAFÍO PARA LA VACUNA EEE-LA TRINIDAD EN EP

Identificación	Edad (años)	Vacunados				AV
		M1	M2	M3	M4	
1	3	37,3	37,4	37,4	37,6	Pos. (5)
2	1	37,5	37,6	37,6	37,7	Pos. (6)
3	3	37,2	37,2	37,2	37,4	Neg.
4	1	37,6	37,6	37,7	37,7	Neg.
5	1	37,3	37,4	37,5	37,5	Neg.
6	1	37,7	37,7	37,7	37,9	Pos. (5)
Testigos						
7	1	37,4	37,3	37,3	37,5	Neg.
8	3	37,3	37,4	37,4	37,6	Pos (6)
9	7	37,5	37,5	37,5	37,6	Pos (4)

AV: aislamiento viral. Pos: positivo. Neg: negativo. M1 a M4: Promedio de temperatura a.m. y p.m. durante los diferentes momentos del experimento. Número entre paréntesis: día del aislamiento.

sultó positivo en muestras colectadas los días 21 y 28 después de la vacunación y negativos en los testigos. Los Ac IHA resultaron negativos en vacunados y testigos durante el mismo período. Después del desafío se detectó positividad a Ac IHA en 3/6 vacunados y en los tres testigos.

La TABLA III muestra los valores promedios de temperatura a.m. y p.m. de los diferentes momentos (M1-M4), los

mismos se ubican dentro de los valores normales, el análisis de la prueba F del programa Statgraphics para los diferentes momentos utilizando todos los valores promedios de temperatura a.m. y p.m. mostraron diferencias significativas entre ( $P < 0,1$ ) y ( $P < 0,01$ ) entre tratamientos, momentos y efecto de la interacción entre momentos y tratamientos. La comparación de medias entre vacunados y testigos (tratamiento 1 y 2,

**TABLA II**  
**RESULTADOS DE DETECCIÓN VIRAL Y DESARROLLO DE ANTICUERPOS EN ANIMALES VACUNADOS Y TESTIGOS. VACUNA EEE-TUCACAS-CV**

Asno N°	Edad (años)	AV	Anticuerpos				
			IH			SN	
			PV(0)	Postvacunados	PD	PV(0)	PSTV
Vacunados							
274	2 Meses	N	N	N	P(30)	N	P(21)
282	1	N	N	N	N	N	P(21, 28)
285	13	N	N	N	P(10, 17)	N	P(21, 28)
289	3	N	N	N	P(17)	N	P(21, 28)
291	3	N	N	N	N	N	P(21, 28)
298	1,5	N	N	N	N	N	P(21, 28)
Testigos							
275	1 Mes	P(1, 2, 3)	N	N	P(10-17)	N	N
281	3	P(3)	N	N	P(10, 17, 30)	N	N
288	4	P(3, 4, 7)	N	N	P(10, 17, 30)	N	N

AV: aislamiento viral. IH: inhibidores de hemoaglutinación. SN: seroneutralizantes. PV: anticuerpos previos a la vacunación día "0". PSTV: anticuerpos postvacunación. PD: anticuerpos post exposición. N: negativo. P: positivo. Número entre paréntesis: día del aislamiento.

**TABLA III**  
**RESULTADOS DEL PROMEDIO DE TEMPERATURAS AM Y PM DE 10 DÍAS EN ASNOS VACUNADOS Y TESTIGOS Y EN LOS DIFERENTES MOMENTOS DEL ENSAYO. VACUNA EEE-TUCACAS**

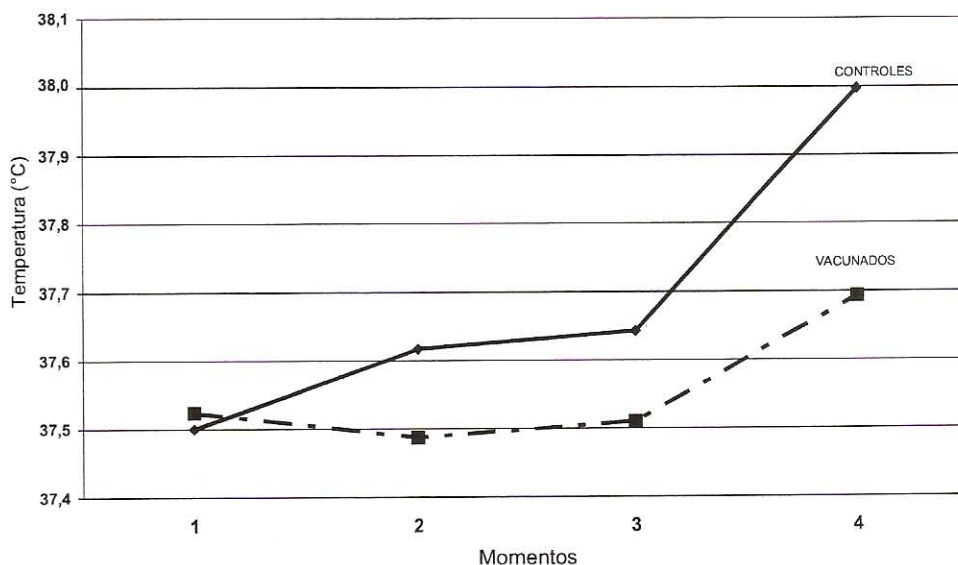
Vacunados						
Asno N°	Edad (años)	M1	M2	M3	M4	
274	2 meses	37,7	37,8	38,0	38,1	
282	1	37,5	37,4	37,5	37,7	
285	13	37,5	37,4	37,5	37,6	
289	3	37,5	37,6	37,6	37,6	
291	3	37,5	37,3	37,2	37,7	
298	1,5	37,5	37,5	37,5	37,8	
Promedio de T		37,53 <sup>ac</sup>	37,50 <sup>ac</sup>	37,55 <sup>ac</sup>	37,75 <sup>bc</sup>	
Testigos						
275	1 mes	37,6	38,0	37,9	38,3	
281	3	37,5	37,4	37,4	37,7	
288	4	37,4	37,5	37,6	38,0	
Promedio de T		37,50 <sup>ac</sup>	37,63 <sup>ad</sup>	37,63 <sup>ad</sup>	38 <sup>bd</sup>	

a,b: letras distintas indican diferencias estadísticas entre los momentos (columnas). c,d: letras distintas indican diferencia estadística entre tratamientos. T: expresada en grados centígrados. M1: promedio de temperaturas a.m. y p.m. durante 10 días previos a la vacunación. M2: promedio de temperaturas a.m. y p.m. durante 10 días después de la 1ª dosis vacunal. M3: promedio de temperaturas a.m. y p.m. durante 10 días después de la 2ª dosis vacunal. M4: promedio de temperaturas a.m. y p.m. durante 10 días después del desafío.

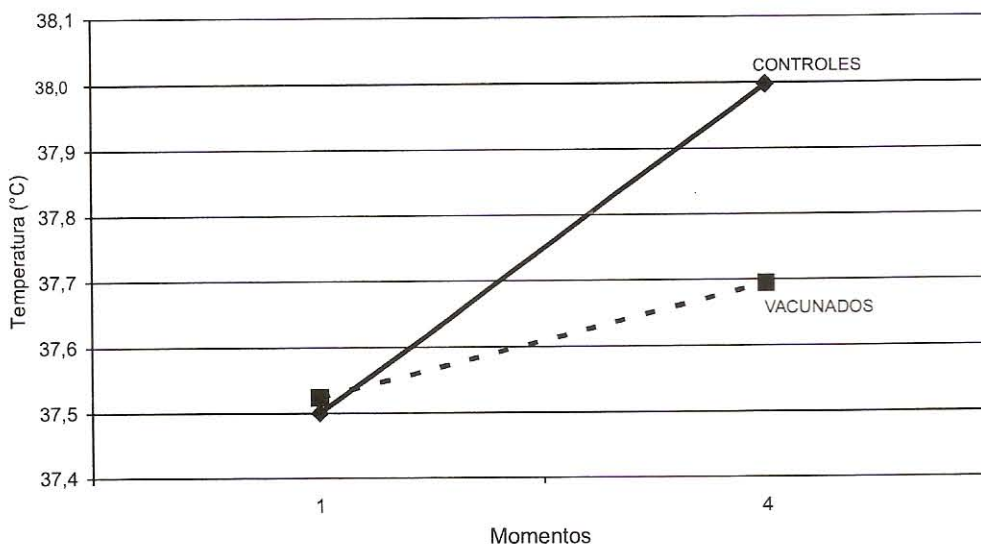
respectivamente) mediante la prueba de Tukey con un intervalo de confianza 95% indicó diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ). En relación con las diferencias entre los momentos se puede observar que éstas se presentaron entre los tres primeros con respecto al último, no encontrándose diferencia entre los tres primeros. En la FIG. 1 de la interacción, se aprecia que en el momento cuatro es donde se alcanza la mayor diferencia en las temperaturas promedio. Igualmente se observó en la misma figura de la interacción muestra que la tendencia de las temperaturas a partir del momento M2 es muy similar entre los tratamientos y que la diferencia menor se presenta entre los momentos 1 y 2 que es realmente donde se visualiza mejor la interacción (FIG. 1). La FIG. 2 muestra el efecto de los tratamientos (vacunados y testigos), el cual se maximiza al

comparar los momentos 1 y 4 (M1-M4) temperatura, prevacunación y temperatura después del desafío. En los asnos testigos después de la EVI y durante M4 se obtiene un incremento mayor de la temperatura al compararlos con los asnos vacunados. Esto obedece a que los vacunados ya tenían antecedentes de vacunación (EEE-Tucacas-CV) y AcN y al desafiarlos y estar protegidos, el alza térmica fue menor (FIG. 2).

Los tres testigos dieron aislamiento viral positivo y dos de los tres mostraron signos de enfermedad, los vacunados no mostraron signos de enfermedad ni produjeron aislamiento viral, en consecuencia, el cálculo de la fracción preventiva es igual a 1,  $FP = 1 - FR$ .  $FR = 0/6$  entre  $3/3 = 0$ .  $FP = 1 - 0 = 1$  (aislamiento viral)  $FP = 1 - FR$ .  $FR = 0/6$  entre  $2/3 = 0$ .  $FP = 1 - 0 = 1$  (enfermedad) valor satisfactorio. El control de la seguridad bio-



**FIGURA 1. VACUNA EEE-TUCACAS-CV: PROMEDIOS DIARIOS DE TEMPERATURA DE LOS ASNOS VACUNADOS Y LOS CONTROLES DURANTE LOS DIFERENTES MOMENTOS: PREEVALUACIÓN, VACUNACIONES Y DESAFÍO.**



**FIGURA 2. VACUNA EEE-TUCACAS-CV: COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE TEMPERATURA DE ASNOS Y CONTROLES ANTES DE LA VACUNACIÓN Y DESPUES DEL DESAFÍO CON 621.000 DOSIS.**

lógica fue satisfactoria, no se evidenció enfermedad o muerte en hámster ni asnos sanos centinelas, así como tampoco desarrollaron AclHA durante la evaluación de las vacunas La Trinidad y Tucacas.

## DISCUSIÓN

La frecuencia y amplia distribución geográfica del virus EEE en poblaciones de équidos susceptibles, aunado a la ausencia de vacunas elaboradas con cepas autóctonas del mismo virus que protejan contra las cepas epizooticas presentes en el país, originaron la preparación y control de vacunas con cepas venezolanas del virus EEE [24], los resultados obtenidos motivaron la evaluación preliminar en asnos de las vacunas elaboradas con la cepa La Trinidad y Tucacas.

Los resultados obtenidos con la vacuna La Trinidad elaborada en EP evaluada en asnos, no mostró diferencias entre vacunados y testigos, ni antes ni después del desafío, en ninguno de los parámetros que fueron seleccionados para evaluar la vacuna. No se apreciaron fiebre ni otros signos clínicos, tampoco fueron detectados Ac IHA o AcN, después de la EVI con 35.280 DL<sub>50%</sub>RLIC/mL. Hubo aislamiento viral a partir del 50,0% de los animales vacunados (3/6) y en el 66,7% de los testigos (2/3). Tesh y col. [26], evaluando una vacuna comercial inactivada con formol contra Encefalitis del Oeste del Nilo en hámsters, encontraron después de dos dosis vacunales AclHA bajos, que ninguno de los vacunados mostró signos de enfermedad o muerte después del desafío con virus infeccioso (DVI); sin embargo, 6/9 hámsters vacunados tuvieron un incremento sustancial en el título de AclHA después del RVI y 2/9 dieron viremia positiva, esto sugiere que la repuesta inmune a la vacuna inactivada fue insuficiente para inhibir completamente la replicación viral. En la vacuna La Trinidad, la fracción protegida en base al aislamiento viral fue de 0,25, valor que no es satisfactorio. Entre las causas que pudieran influir en estos resultados se hicieron las siguientes consideraciones. La cepa La Trinidad fue aislada de cerebro de equino y pool de órganos (cerebro, corazón, riñón, hígado páncreas, etc.) revelando títulos expresados en Dex de 3,5 e  $\geq 2,5$ DL<sub>50%</sub>RLIC/25  $\mu$ L respectivamente. Si el reto en los asnos fue realizado con un segundo pase en CRL de la cepa homóloga, la cual, con buena capacidad de replicación en CRL y EP y habiendo mostrado buena carga viral en el pase cero de cerebro de equino y pool de órganos, se esperaba el aislamiento viral después del DVI. En los testigos, sólo se aisló virus en dos de ellos, esto pudiera ser debido a una respuesta individual del control por el mismo o por una inoculación deficiente en volumen o cantidad de virus inoculados. El aislamiento viral en tres vacunados y la ausencia de AclHA y AcN antes y después del DVI pudiera ser debido a una inmunización parcial o a la ausencia de Ac humorales, sin ser esto el presente caso ni ser indicativo de falta de protección, ya que puede haber protección celular, como fue descrito por Barber y col. [2]. El esquema de aplicación IM de la vacuna con doble dosis e intervalo de siete días entre dosis y 14

días después el reto con 35.280 DL<sub>50%</sub>RLIC del segundo pase en CRL no fue satisfactorio, aun cuando fue suficiente para originar aislamiento viral en vacunados y testigos, no lo fue para mostrar diferencia en ninguno de los parámetros establecidos para su evaluación. Hay reportes de buenos resultados utilizando el esquema de aplicación de vacuna EEE-SNA con igual intervalo en la aplicación de las dosis pero utilizando la vía ID [18]. En los resultados de la vacuna La Trinidad-EP también pudo haber influido el método de inactivación y el sustrato de replicación del virus. El crecimiento del virus en cultivos celulares es más fácil de manejar o inactivar que cuando el virus es producido en otro tejido más complejo que las células. El método de inactivación de la vacuna en prueba (formol 0,4%/37°C/72 horas) usado en su forma directa más simple, sin aditivos, puede haber repercutido sobre la potencia protectora degradando el tamaño de los componentes que contienen los determinantes inmunogénicos [13, 15]. También deben ser consideradas en la obtención de los resultados la sensibilidad de las pruebas utilizadas y posibles fallas humanas.

En la vacuna elaborada con la cepa Tucacas producida en células Vero, los asnos arrojaron valores de temperatura dentro de los límites normales en vacunados y testigos, excepto el testigo que ingresó al experimento con un mes de edad, que mostró fiebre los tres primeros días después del DVI alcanzando niveles hasta de 39,8°C, el análisis estadístico de las temperaturas reveló que los grupos de vacunados y testigos pertenecían al mismo universo y se empiezan a diferenciar después de la aplicación de la primera dosis vacunal, siguiendo la misma tendencia en cada grupo o tratamiento, haciéndose la diferencia altamente significativa después de la exposición entre tratamientos 1 y 2 y momentos M<sub>1</sub> a M<sub>4</sub> (P < 0,01). Los trabajos de Barber y col. [2], utilizando cepa del SNA obtuvieron un alza térmica en los testigos después del DVI EEE alcanzando temperaturas de 40,5°C durante el curso de su enfermedad fatal por cepa SNA en los testigos y un incremento de 1°C en los vacunados después del DVI. Parra y col. [17], evaluando una vacuna EEV en asnos, al igual que en el presente trabajo, no detectaron alza térmica en los vacunados, siendo la misma, positiva en los testigos después de la exposición.

La intensidad de los signos clínicos de enfermedad está relacionada con la naturaleza de la cepa infectante, los virus pertenecientes a los SNA están relacionados con alta mortalidad y secuelas neurológicas generalmente no reversibles en los sobrevivientes équidos o humanos; las cepas del SSA causan enfermedad más moderada en los équidos, sin causar prácticamente enfermedad en los humanos [14]; la expresión clínica de los asnos en estos ensayos y la ausencia de casos clínicos comprobados en humanos de Venezuela apoyan la naturaleza de variedades suramericanas de los aislamientos venezolanos.

El virus EEE-SNA en la vacuna trivalente evaluada por Baber y col. [2] y la EEE Tucacas-SSA revelaron diferencias en intensidad del alza térmica, otros signos clínicos y sobrevi-

vencia de los asnos en la vacuna en evaluación, obedece a la naturaleza patogénica de los subtipos que intervinieron. Hubo detección de virus en los tres testigos y leve expresión clínica en dos de ellos después del DVI, comparable a los resultados obtenidos por Baber y col. [2] y Parra y col. [17]. La detección de AcN en muestras recolectadas 21 y 28 días después de la segunda dosis vacunal y la ausencia o desaparición de AcIHA en las mismas muestras [19, 23] y la evidencia de AcIHA después del DVI en el 100% de los testigos a partir del décimo día fue similar a los de los resultados obtenidos en vacunas inactivadas de encefalitis equina en asnos y equinos en cautiverio, primovacunados o libres de AcIHA y AcN [2, 17], en equinos en haras [23] y humanos [3, 25]. La respuesta en el desarrollo y duración de los Ac pudiera ser debido a sensibilidad de las pruebas en la detección de AcIHA, ausencia legítima de Ac humorales [2], homología o no de los antígenos usados en la prueba y los anticuerpos producidos por los antígenos de la vacuna. La aparición de AcIHA después del DVI en los animales vacunados (50,0%) pudiera sugerir que la inmune a la vacuna inactivada fue insuficiente para inhibir respuesta completamente la replicación viral [26] o estar relacionado al número de dosis (631.000) del DVI, lo cual más bien estimula la formación de Ac como una acción (booster).

## CONCLUSIONES

Aun cuando el número de asnos usados en la evaluación de las dos vacunas inactivadas fue escaso, los resultados obtenidos con las vacunas elaboradas con la cepa Tucacas producida en células Vero permiten recomendarla ampliamente por haber soportado el desafío con una cantidad suficiente de virus, sin que los vacunados mostraran signos clínicos ni aislamiento viral, contrario a los testigos que después del desafío presentaron al aislamiento viral en todos y exposición clínica en el 66,7%, dado que los vacunados por su vacunación previa tienen AcN y estaban protegidos. Por otra parte, los resultados obtenidos en la evaluación preliminar de producción y control de la misma en animales de laboratorio también fueron satisfactorios.

## AGRADECIMIENTO

Se agradece la colaboración técnica en la ejecución de este trabajo del Personal Técnico y Secretarial de la Sección de Arbovirus del Instituto de Investigaciones Veterinarias, INIA - Aragua.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARMISTEAD, W.W; HENDERSON, J.A; JONES, T.L; McLEAN, J.W; SCHNELLE, G.B. **The Merck Veterinary Manual**. 3<sup>rd</sup> Ed. Edited by Sigmund, O.N. Rahuey, New Jersey. Merck. Part I. Dental development. Estimation of age by the wear of the teeth. 74-78pp. 1967.
- [2] BARBER, T.L.; WALTON, T.E.; LEWIS, K.J. Efficacy of Trivalent Inactivated Encephalomyelitis Virus Vaccine in Horses. **Am. J. Vet. Res.** 39(4): 621-625. 1978.
- [3] BARTELLONI, P.J.; MCKINNEY, R.W.; DUFFI, T.P.; COLE, F.P. Jr. An inactivated Eastern equine encephalomyelitis vaccine propagated in chick embryo cell culture. II Clinical and serologic responses in man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 19(1): 123-126. 1970.
- [4] BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M.; ARUNDEL, J.H.; GAY, C.C. Temperature in clinical examination and making a diagnosis. In: Part one General Medicine. **Veterinary Medicine** 7<sup>th</sup> Ed. 1502 pp. 1989.
- [5] BRAULT, A.C.; POWERS, A.M.; VILLARREAL-CHAVEZ, C.L.; NAVARRO-LOPEZ, R.N.; FRAIRE-CACHON, M.; LIERA-GUTIÉRREZ, F.; KANG, W.; TESH, R.B.; SHOPE, R.E.; WEAVER, S.C. Genetic and antigenic diversity among Eastern equine encephalitis viruses from North, Central and South America **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 61(4): 579-586. 1999.
- [6] CALISHER, CH.; LEVY-KOENIG, E.; MITCHEL, C.J.; CABRERA, F.A.; CUEVAS, L.; PEARSON, J.E. Encefalitis equina del Este en la República Dominicana, 1978. **Bol. Of. Sanit Panam.** 90(1): 19-31. 1981.
- [7] CALISHER, CH.H.; SHOPE, R.E.; BRANDT, W.; CASALS, J.; KARABATZOS, W.; MURPHY, F.A.; TESH, R.B.; WIEBE, M.E. Proposed antigenic classification of registered Arbovirus. I Togaviridae, Alphavirus. **Intervirology** 14: 229-232. 1980.
- [8] CASALS, J. Antigenic variants of Eastern Equine Encephalitis virus. **J. Exp. Med.** 119(4): 547-565. 1964.
- [9] CENTER FOR VETERINARY BIOLOGICS. USA. Veterinary services. Memorandum 800. 200. Efficacy Studies. Prevented Fraction. January 18, 1-7 pp. 2000.
- [10] CLARKE, D.H.; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 7:561-573. 1958.
- [11] DIETZ Jr.; W.H.; GALINDO, P.; JOHNSON, K.M. Eastern equine encephalomyelitis in Panama. The epidemiology of the 1973 epizootic. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 29(19): 133-140. 1980.
- [12] FENNER, F; BACHMAN, P.A.; PAUL, E.; GIBBS, J.; MURPHY, A.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O. **Pathogenesis Togaviridae and Flaviviridae in Veterinary Virology**. Academic Press. INC Orlando Florida. 451-472 pp. 1987.
- [13] GRUBER, J. Purification, concentration and inactivation of Venezuelan equine encephalitis virus. **Appl. Microbiol.** 20(3): 427-432. 1970.
- [14] MORRIS, C.D. Eastern equine encephalomyelitis: The Arboviruses Epidemiology and Ecology Vol. III. Chapter

24. T.P. Monath (Ed.) CRE Press Boca Raton. Fla. 1-20 pp. 1988.
- [15] MUSSGAY, M.; BERGOLD, G.; WEILAND, E.; UEBERSCHAR, S. Preparation and evaluation of inactivated Venezuelan equine encephalitis vaccines. **Zbl. Vet. Med.** B. 19, 511-517. 1972.
- [16] PARRA, D.; SIGER, J. de; MACKENZIE, R.B. Prevalencia de anticuerpos del virus de Encefalitis Equina Venezolana en animales domésticos en algunas regiones de Venezuela. 1972-1975. **Vet. Trop.** 1(1): 93-115. 1976.
- [17] PARRA, V. D.; SIGER, J. de; PEREZ-BARRIENTOS, M.; MUSSGAY, M.; MACKENZIE, R.B. Evaluation in donkeys of an inactivated Venezuelan equine encephalitis vaccine. **Zbl. Vet. Med.** 22: 162-168. 1975.
- [18] POLANCO, R.; CHAVEZ, P.; FERNÁNDEZ, A.; VRTIAK, O.J.; KAPITANCIK, B. Importancia de la vacunación en el control de la Encefalomiélitis equina del Este (EEE) en la República de Cuba. **Folia Veter.** 27(1); 83-89. 1983.
- [19] POLANCO, R.; CARRERO, R.; REDONDO, M.; VRTIAK, O.J.; KAPITANCIK, B. Inmunización de equinos entre 7 y 10 meses de edad con una vacuna inactivada de encefalomiélitis equina del Este (EEE) II Dinaámica de los anticuerpos neutralizantes (N) y los de inhibición de la hemoaglutinación (IH) **Folia Veter.** 27(1): 63-73. 1983.
- [20] ROEHRING, J.T.; AUNT, A.R.; CHANG, G.J.; SEIK, B.; BOLIN, R.A.; TSA, T.F.; TRENT, D.W. Identification of monoclonal antibodies capable of differentiating antigenic varieties of eastern equine encephalitis viruses **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 42:394-398. 1990.
- [21] SCOTT, T.W.; WEAVER, S.C. Eastern equine encephalomyelitis viruses: Epidemiology and evolution of mosquito transmission. **Adv Virus. Res.** 37:277-328. 1989.
- [22] SIGER, J. de; METTLER, N; CASTAÑEDA, J. First Isolation of Eastern encephalomyelitis virus from a horse in Venezuela. **19<sup>th</sup> Annual Proceedings. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians.** Miami Beach, Fl. November, 229-236 pp. 1976.
- [23] SIGER, J. de; PARRA, V.D.; PEREZ-BARRIENTOS, M.; MACKENZIE, R.B. Dos vacunas a virus inactivados de Encefalitis Equina Venezolana: Niveles de anticuerpos en caballos pura sangre, después de su aplicación. En: **Conferencia internacional sobre vacunas contra la Encefalitis equina.** OPS/OMS Centro Panamericano de Zoonosis. Maracay. 11-17 Agosto (Mimeografiado). 9 pp. 1974.
- [24] SIGER, J. de; PULGAR, G.E; MEDINA-GUTIÉRREZ G; MATHEUS, I.; PEREZ-BARRIENTOS, M. Encefalitis equina del este, Cepas Suramericanas I: Preparación de una vacuna inactivada y su evaluación en animales de laboratorio. **Rev. Científ. FCV-LUZ** XIV(6): 539-567. 2004.
- [25] STRIZKI, J.M.; REPIK, P.M. Differential reactivity of immune sera from human vaccinees with field strains of Eastern equine encephalitis virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 53(5): 564-570. 1995.
- [26] TESH, R.B.; ARROYO, J.; TRAVASSOS DA ROSA A., P.A.; GUZMÁN, H; XIAO, S-Y.; MONATH, T.P. Efficacy of killed virus vaccines, live attenuated chimeric virus vaccines and passive immunization for prevention of west nile virus encephalitis in hamster model. **Emerg. Infect. Dis.** 8(12): 1392-1397. 2002.
- [27] WALDER, R.; ROSATE, R.R.; EDDY, G.A. Virion polypeptide heterogeneity among virulent and avirulent strains of Eastern Equine Encephalitis (EEE) virus. **Arch. Virol.** 68: 229-237. 1981.
- [28] WALDER, R.; SUAREZ, O.M. Primera evidencia en Venezuela de la Encefalitis Equina del Este (EEE) en circunstancias silentes. **Bol. Div. Mal. San Amb.** XVI(2): 119-125. 1976.
- [29] WEAVER, S.C.; HAGENBAUG, A.; BELLEW L.A.; GOUSSET, L.; MALLAMPALLI, V.; HOLLAND, J.J.; SCOTT, T-W. Evolution of alphaviruses in the Eastern equine encephalomyelitis complex. **J. Virol.** 68: 1158-169. 1994.