

**DESARROLLO DE UNA VACUNA INACTIVADA OLEOSA CON CEPA VENEZOLANA
DEL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA DEL ESTE**

***Oil Inactivated Vaccine Development with Venezuelan Strain of
Eastern Equine Encephalitis Virus***

María C. González^{*1}, Nelson Pérez^{**} y Víctor Bermúdez^{***}

Laboratorio Clínico, División de Servicio Médico Asistencial y Preventivo, Campus Maracay, Universidad Central de Venezuela, **Laboratorio de Arbovirus, Sanidad Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Maracay, *Cátedra de Patología, Departamento de Patología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela*

Correo-E:mcgm1957@hotmail.com

Recibido: 28/03/14 - Aprobado: 20/11/14

RESUMEN

Se utilizó la cepa El Pao de encefalitis del este venezolana, aislada en el 2002 (EE VE02 EL PAO) como antígeno, para producir una vacuna inactivada oleosa contra el Virus de la Encefalitis Equina del Este (VEEE) en tres formulaciones, a saber: formulación I (F1): antígeno-fase oleosa; formulación II (F2): antígeno-fase oleosa-medio de mantenimiento y formulación III (F3): antígeno-fase oleosa-antígeno. La suspensión de virus se obtuvo en monocapa de cultivo de células de riñón de mono verde africano. Como inactivante se usó la etilenimina binaria (BEI) con adyuvante incompleto de Freund. Se realizaron pruebas de identidad, carga viral, esterilidad, fisicoquímica, inocuidad, potencia, inmunidad y viabilidad. Todas estas pruebas de control de calidad fueron satisfactorias. Cuando las formulaciones se administraron a cobayos, estimularon títulos de anticuerpos por inhibición de la hemoaglutinación ≥ 20 y de seroneutralización ≥ 40 , a los 21 d postvacunación con 1 dosis de 1 mL por vía subcutánea. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en la detección de anticuerpos entre las formulaciones a los 21 días posvacunación, aunque la F3 presentó mayores títulos, seguida de la F2 y la F1, respectivamente ($P < 0,01$). Los anticuerpos neutralizaron in vitro las

ABSTRACT

The Pao of eastern encephalitis venezuelan isolated in 2002 (EE VE02 EL PAO) strain was used as an antigen to produce an inactivated oil vaccine against the Eastern Equine Encephalitis Virus (EEEV) in three formulations, as follows: Formulation I (F1): antigen in oil phase; Formulation II (F2): antigen in oil phase-maintenance medium; and Formulation III (F3): antigen-oil phase-antigen. The virus suspension was obtained from African green monkey kidney monolayer cell cultures. The binary ethylenimine (BEI) was used to inactivate the virus, along with an incomplete Freund's adjuvant. The following quality control tests were performed: identity, viral load, sterility, physicochemical, safety, potency, immunity, and viability. All these tests were satisfactory. The administration to guinea pigs of a single subcutaneous dose of 1 mL of the formulations, caused stimulated antibody titers by hemagglutination inhibition (≥ 20) and serum neutralization (≥ 40), respectively, at 21 days post-vaccination. No statistically significant differences ($P > 0.05$) in the detection of antibodies between formulations at 21 days post-vaccination were observed, although F3 had higher titles, followed by F2 and F1, respectively ($P < 0.01$). The

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

cepas virulentas del VEEE, y los cobayos vacunados no desarrollaron viremia ni enfermedad neurológica con el desafío de virus vivo, tanto por vía intracerebral como por vía intraperitoneal, en las pruebas de potencia. Se concluye que la vacuna es segura y provee una excelente protección contra la infección del VEEE.

(Palabras clave: Vacuna inactivada; virus de la encefalomyelitis equina; anticuerpos; control de calidad; enfermedades infecciosas)

INTRODUCCIÓN

Las encefalitis equinas en las Américas, son producidas por tres miembros de la familia Togaviridae, género *Alfavirus*: Virus de la Encefalitis Equina del Este (VEEE), Virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) y Virus de la Encefalitis Equina del Oeste (VEEO) [1-3]. Estos virus causan infección enzoótica y epizootica en equinos y la susceptibilidad del hombre les da una gran importancia en salud pública [1,4]. En Venezuela, circulan el VEEV y VEEE [5,6]. El VEEE en Norte América causa enfermedad neurológica severa en todas las especies, pero en Sur América pocos casos fatales en humanos han sido documentados, quizás porque muchos han sido mal diagnosticados. Aunque en Sur América las epizootias son limitadas, la enfermedad es grave [7,8]. La infección sub clínica en humanos y animales domésticos es común, su detección solo ocurre durante las epizootias y la circulación silente no se detecta, al menos que sea por pruebas serológicas [9]. En Venezuela, la enfermedad es esporádica y estacional, los casos clínicos en equinos se presentan en zonas distantes, relacionados con la presencia de aguas estancadas, vertebrados amplificadores y mosquitos [10].

De acuerdo a ensayos serológicos, el complejo de VEEE, es una sola especie y se han distinguido dos variantes antigénicas, la Norte Americana (NA) y la Sur Americana (SA). La NA comprende aislados de Canadá, Estados Unidos e islas del Caribe y la SA aislados de Centro y Sur América [3,7,11]. Se han identificado cuatro linajes. El linaje I comprende la variante NA cuyos aislados son altamente conservados. Los linajes II-IV comprenden la SA, los cuales presentan heterogeneidad genética [7]. El estudio filogenético de la cepa El Pao de encefalitis

antibodies neutralized EEEV virulent strains in vitro and the vaccinated guinea pigs did not develop viremia or neurological disease, when challenged with live virus, both intracerebrally and intraperitoneally in potency tests. It is concluded that the vaccine is safe and provides excellent protection against EEEV infection.

(Key words: Vaccine inactivate; equine encephalomyelitis virus; antibodies; quality controls; infectious diseases)

del este venezolana, aislada en el 2002 (EE VE02 EL PAO), evidenció variación genética con respecto a otras cepas autóctonas, difirió en un 8,86% de la cepa SA de Perú y en un 38,08% de la cepa NA de EUA [12,13]. Estos resultados son similares a los reportados por Brault *et al.* [7], quienes señalaron que las NA difieren de las SA en un 25-38%. La NA tiene conservación genética y antigénica, mientras que la SA no la tiene. Por esta razón, las vacunas producidas con la NA tienen poco efecto en la SA [14].

Las vacunas, representan una de las estrategias para el control de enfermedades infecciosas. Por lo tanto, son una herramienta importante en los programas de control de la encefalitis equina. Debido a la ausencia de una vacuna nacional contra el VEEE y el conocimiento de las diferencias genéticas y antigénicas existentes entre las cepas autóctonas (SA) y las cepas NA, con la cual se preparan las vacunas comerciales importadas que se utilizan en Venezuela, se consideró la idea de preparar una vacuna para la inmunización de équidos, de modo de dar protección real frente a las cepas actuantes en el país. Por consiguiente, se tuvo como objetivo preparar una vacuna inactivada con etilenimina binaria y adyuvante oleoso de Freund en tres formulaciones y realizar pruebas de control de calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa EE VE02 EL PAO de VEEE originaria de un brote en el año 2002, fue aislada por el laboratorio de Arbovirus, Sanidad Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas a partir del cerebro de un equino muerto en el Municipio El Pao de San Juan Bautista, Parroquia El Pao,

localidad Zambrano del estado Cojedes, Venezuela. Esta cepa viral se identificó ultraestructuralmente, por microscopia electrónica de transmisión (Philips CM10, Eindhoven, Holanda), luego de ser teñida negativamente con ácido fosfotúngstico al 2%, y pH 6,5. Para preparar la vacuna el aislado viral se adaptó a crecimiento, primero se replicó en cerebro de ratón lactante, cepa BALBc de 3 d de edad y luego en monocapa de cultivo de células Vero (riñón de mono verde africano) con tres pases. Para la producción de antígeno, la suspensión viral para la vacuna se obtuvo en monocapa de cultivo de células Vero, con un título infeccioso de dosis letal ratón lactante intracraneal cincuenta por ciento (DLRLIC50%) $10^{8.6}$ /mL. La suspensión de virus fue purificada por centrifugación a 2000 g por 30 min a 4°C y se identificó serológicamente por fijación de complemento, seroneutralización y hemoaglutinación. Para la inactivación viral la etilenimina binaria (BEI) se preparó a partir del bromohidrato de bromoetilamina 0,1 M en NaCl 0,175 N en baño de agua a 37°C x 1 h. Se agregó BEI a la suspensión viral clarificada a una concentración final de 3 mM. La inactivación se llevó a cabo a 26°C durante 24 h en agitación constante y se neutralizó con tiosulfato de sodio al 10%.

Para la formulación de la vacuna se utilizó el adyuvante incompleto de Freund al 90% y el octodocenoato de anhidromanitol al 10% (ISA 50, Sepic, Francia), para formar una emulsión estable de tipo agua-aceite [15]. Se prepararon tres formulaciones: formulación I: antígeno-fase oleosa; formulación II: antígeno-fase oleosa-medio de mantenimiento y formulación III: antígeno-fase oleosa-antígeno. Para la elaboración de la vacuna se utilizó un emulsificador de mesa JANKE KUNKEL, IKA-WER, ULTRA-TURRAX (Tekmar Company, EUA). Primero se preparó una emulsión simple (formulación I) de acuerdo a lo sugerido [15], y a partir de ésta se prepararon dos tipos de emulsión doble (formulación II y III). A las formulaciones se les realizó pruebas de esterilidad, inocuidad, potencia, inmunidad, viabilidad y fisicoquímicas.

Los controles de esterilidad fueron realizados en todas las etapas de producción y en el producto final, y se determinaron en los siguientes medios de cultivo: caldo tioglicolato, caldo Frey's, agar glucosa sabouraud y agar sangre. Las pruebas fisicoquímicas

aplicadas fueron: prueba de la gota, observación microscópica, prueba de centrifugación, aspecto, color, densidad, pH y estabilidad por 6 meses a 37°C y 12 meses a 4°C. La inocuidad fue determinada por inoculación de 1 mL de cada formulación por vía subcutánea en grupos de 10 pollitos de 6 a 12 h, igualmente en grupos de 10 ratones cepa BALBc de 21 d y en grupos de 10 cobayos (*Cavia porcellus*) de 250 a 300 g, observándose en todos los casos por 30 d.

Se estudió la inmunidad producida por la vacuna a los 90 d post-elaboración, en grupos de 20 cobayos para cada formulación y 10 cobayos sin vacunar de 250 a 300 g de peso vivo (PV). Se suministró una dosis de 1 mL por vía subcutánea y a los 21 d post-vacunación se evaluaron los niveles de anticuerpos por seroneutralización (SN) e inhibición de la hemoaglutinación (IH). En la prueba de SN, se utilizó como antígeno la cepa EE VE75 CATATUMBO de VEEE y se realizaron diluciones de los sueros hasta 1/80. En la prueba de IH, se utilizó como antígeno las cepas EE VE84 TUCACAS de VEEE y la cepa TC-83 de VEEV y se realizaron diluciones de los sueros hasta 1/40. Algunos sueros se probaron con las cepas EE VE02 EL PAO, EE VE76 EL DELIRIO y EE VE96 MLLANO de VEEE.

La viabilidad o estabilidad inmunológica se evaluó a los 530 d post-elaboración, en grupos de 10 cobayos para cada formulación y 10 cobayos sin vacunar de 250 a 300 g PV. Se suministraron dos dosis de 1 mL por vía subcutánea con 7 d de intervalo y a los 21 d después de la segunda dosis se evaluaron los niveles de anticuerpos por IH. En este lapso post-elaboración se realizaron diluciones de los sueros hasta 1/160 y se utilizaron los mismos antígenos usados a los 90 d post-elaboración en la prueba de IH.

Se realizó la prueba estándar de potencia por vía intracerebral de acuerdo a Scherer *et al.* [16] y al Código de Regulaciones Federales [17] a los 530 d post-elaboración de la vacuna. Para ello, se utilizaron 10 cobayos para cada formulación y 10 cobayos sin vacunar de 250 a 300 g PV. Se suministraron dos dosis de 1 mL por vía subcutánea con 7 d de intervalo, a los 21 d después de la segunda dosis se realizó el desafío con virus patógeno. Los cobayos vacunados y no vacunados se desafiaron por vía intracerebral con 0,1 mL que contenía 1000

DLRLIC50%/mL de cepa patógena de VEEE. Los cobayos se observaron durante 10 d. Se determinó el porcentaje de muerte y el porcentaje de sobrevivientes. En esta prueba estándar de potencia se probaron para cada formulación las siguientes cepas de VEEE autóctonas: EE VE84 TUCACAS, EE VE76 EL DELIRIO, EE VE75 CATATUMBO, EE VE96 MLLANO y EE VE02 EL PAO.

Una prueba adicional de potencia se efectuó en cobayos por vía intraperitoneal a los 445 d post-elaboración. Para ello, se utilizaron 10 cobayos para cada formulación y 10 cobayos sin vacunar de 250 a 300 g. Se suministraron dos dosis de 1 mL por vía subcutánea con 7 d de intervalo, a los 21 d después de la segunda dosis se realizó el desafío con virus patógeno. Todos los cobayos se desafiaron con 0,1 mL que contenía 1100 DLRLIC50%/mL de cepa patógena de VEEE (EE VE96 MLLANO) por vía intraperitoneal y los cobayos se observaron durante 10 d. A los 10 d post-desafío, se evaluaron los niveles de anticuerpos por IH.

Los resultados fueron analizados por el método de diferencia de proporciones, análisis de varianza y el análisis de Kruskal Wallis mediante el programa estadístico Statistix versión 8.0 (Analytical Software de IBM).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cepa EE VE02 EL PAO de VEEE se estudió en detalle y se identificó ultraestructuralmente. En la Figura 1 se observan cuatro partículas virales intactas, esféricas con nucleocápside icosaédrica, que muestran una envoltura externa de tipo cutánea firmemente adherida a la nucleocápside, con proyecciones cortas en la superficie, que son los peplómeros glucoproteicos. Las partículas virales presentaron un tamaño promedio de 47 nm de diámetro. Estas características morfológicas coinciden con las observadas por Mohanty y Dutta [18] y el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades [19] en virus pertenecientes a la familia Togaviridae. La microscopía electrónica de transmisión, permite la identificación directa de las partículas virales y proporciona el primer juicio básico para clasificar a este virus dentro de la familia Togaviridae. En esta perspectiva, esta cepa viral se identificó serológicamente mediante las pruebas de fijación de complemento, seroneutralización y

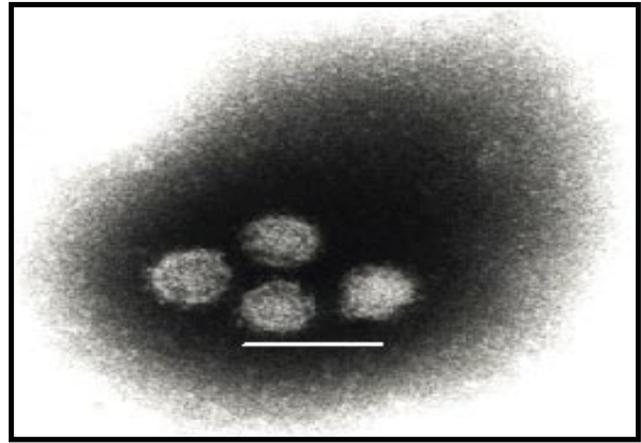


Figura 1. Micrografía electrónica de la cepa EE VE02 EL PAO de virus de encefalitis del este, contrastada con ácido fosfotúngstico. 200.000 X. Barra 100 nm

hemoaglutinación.

Las vacunas inactivadas, se han venido usando desde que la encefalitis equina apareció en el continente americano y se han venido ensayando diferentes modificaciones del método de producción de vacunas [20]. La vacuna anti-encefalitis equina clásica es preparada con antígeno inactivado con formalina y adyuvante hidróxido de aluminio, es poco inmunogénica y tiene el riesgo de virulencia residual [18, 21, 22]. La formalina, desnaturaliza las proteínas y el ácido nucleico (AN), a diferencia de la etilenimina que solo desnaturaliza el AN y deja sin modificaciones las proteínas superficiales, por lo que no interfiere en su antigenicidad [18, 23]. Un inactivante ideal debe inactivar solo el AN sin afectar la envoltura proteica, ya que los virus inactivados muertos no se multiplican en el animal inmunizado y solo inducen anticuerpos contra los componentes de la superficie del virus [15, 18, 23]. De esta manera, la etilenimina es un inactivante de primer orden, con elevada velocidad de inactivación y mayor estabilidad [15, 18]. Para la mejora de las vacunas clásicas, el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa usa la BEI como inactivante de virus de la fiebre aftosa [24], descrito por Bahnmann [25]; además, reemplazó el hidróxido de aluminio-saponina por el adyuvante oleoso incompleto de Freund. Esta vacuna, proporciona una inmunidad más sólida y duradera que las vacunas clásicas [15, 24]. Por otra parte, Yu y Aaskov [26], prepararon una vacuna inactivada con BEI contra el Alfavirus Río Ross y los anticuerpos inducidos neutralizaron *in vitro* a virus vivos y los ratones desafiados no desarrollaron

viremia. Con base a esta información, se usaron estos compuestos para la elaboración de la vacuna. En este estudio, la BEI fue un eficiente inactivante de VEEE y la eficacia protectora se incrementó con el uso del adyuvante oleoso incompleto de Freund. Los controles de esterilidad en las distintas fases de producción y el producto final, y las pruebas fisicoquímicas e inocuidad fueron satisfactorios.

En el estudio de inmunidad a los 90 d post-elaboración de la vacuna y 21 d post-vacunación en cobayos con una dosis (Cuadro 1), se observa que mediante la prueba de SN el porcentaje de respuesta positiva a la vacunación con títulos de anticuerpos $SN \geq 40$ fue de un 90% para la formulación I, de 100% para la II y de 100% para la III; mediante la prueba de IH, el porcentaje de respuesta positiva a la vacunación con títulos de anticuerpos $IH \geq 20$ fue de un 80% para la formulación I, de 95% para la II y 90% para la III. El análisis de Kruskal Wallis para los resultados en la prueba de SN mostró que no hubo diferencias significativas en la detección de

anticuerpos entre las formulaciones ($P > 0,05$). Con respecto a los títulos de anticuerpos, si se encontró diferencias entre ellas, siendo la III la que presentó mayores títulos ($P < 0,01$), pero no hubo diferencias entre la II y III ($P > 0,05$). Los resultados en la prueba de IH mostraron que no hubo diferencias significativas en la detección de anticuerpos entre las formulaciones ($P > 0,05$). Con respecto a los títulos de anticuerpos, sí hubo diferencias altamente significativas entre ellas, siendo la III la que presentó mayores títulos, seguida de la II y I, respectivamente ($P < 0,01$). En la SN se realizaron diluciones de los sueros hasta 1/80, mientras que en la IH se realizaron diluciones de los sueros hasta 1/40, por lo que se detectaron anticuerpos hasta estas diluciones respectivamente (Cuadro 1).

En la prueba estándar de inmunidad con la vacuna inactivada clásica de acuerdo a Scherer *et al.* [16] y al Código de Regulaciones Federales [17] a los 30 d post-vacunación, con dos dosis y 14 d de intervalo, los títulos de anticuerpos por IH deben ser

Cuadro 1. Prueba de inmunidad a los 90 días post-elaboración de la vacuna. Títulos de anticuerpos (Ac) contra el virus de la encefalitis equina del este (VEEE) mediante la prueba de seroneutralización (SN) e inhibición de la hemoaglutinación (IH) en cobayos a los 21 días post-vacunación con 1 dosis de 1 mL

Cobayo 250-300 g PV	Formulación I		Formulación II		Formulación III		No Vacunados	
	SN	IH	SN	IH	SN	IH	SN	IH
1	80	20	80	20	80	20	0	0
2	80	20	80	40	80	20	0	0
3	80	40	80	20	80	20	0	0
4	80	20	80	20	80	20	0	0
5	40	20	80	20	80	10	0	0
6	80	20	80	20	80	20	0	0
7	80	20	80	20	80	10	0	0
8	40	10	80	20	80	20	0	0
9	80	20	80	20	80	40	0	0
10	0	0	80	20	80	20	0	0
11	0	0	80	20	80	40	0	0
12	80	20	80	20	80	20	0	0
13	80	40	80	20	80	20	0	0
14	80	20	80	10	80	40	0	0
15	80	20	80	20	80	20	0	0
16	80	20	80	20	80	40	0	0
17	80	20	80	40	80	40	0	0
18	80	20	80	20	80	40	0	0
19	80	20	80	40	80	40	0	0
20	80	20	80	20	80	20	0	0
Promedio de Título de Ac a VEEE	68	19,5	78	22,5	80	26	0	0

Detección de Ac ($P > 0,05$); Título de Ac ($P < 0,01$)

≥ 20 y por SN ≥ 40 para una respuesta positiva a la inmunización y los cobayos queden protegidos contra la infección. Con las tres formulaciones de vacuna y con 1 dosis, ya a los 21 d post-vacunación los cobayos tuvieron títulos de anticuerpos por IH ≥ 20 y por SN ≥ 40 , de modo que se obtuvo una respuesta positiva a la inmunización. De igual manera, la Inspección en Salud Animal [27] con la vacuna contra la encefalomielitis equina del este, oeste y venezolana a virus muerto-toxoide tetánico en cobayos a los 42 d post-vacunación con 2 dosis y 21 d de intervalo, obtuvo resultados similares a los encontrados en este estudio a los 21 d post-vacunación con una dosis.

La prueba de potencia realizada por vía intracerebral de acuerdo a Scherer *et al.* [16] y al Código de Regulaciones Federales [17] en cobayos fue satisfactoria, ya que el 100% (10/10) de los cobayos vacunados y retados para cada formulación sobrevivieron y el 100% de los controles no vacunados y retados murieron. Esta prueba tiene la finalidad de comprobar que la vacuna es efectiva y se considera satisfactoria, para proteger contra el agente viral. De acuerdo a Scherer *et al.* [16] y al Código de Regulaciones Federales [17], el 80% de los cobayos vacunados y retados deben sobrevivir y el 80% mínimo de los no vacunados y retados deben morir. En este estudio, todos los cobayos controles no vacunados presentaron manifestaciones neurológicas de encefalitis entre el cuarto y quinto d post-desafío, postración y muerte posterior entre los 10 d. De éstos cobayos muertos se tomó el cerebro y se realizó aislamiento e identificación del VEEE mediante la prueba de SN y hemoaglutinación. Ninguno de los cobayos vacunados presentó manifestaciones neurológicas de encefalitis y se mantuvieron en óptimas condiciones de salud durante el período evaluado. Por consiguiente, los cobayos vacunados soportaron el desafío con las cepas autóctonas. Estos resultados contrastan con los reportados por Siger *et al.* [10] para vacunas comerciales preparadas con cepas NA, donde las mismas no soportaron el desafío con cepas autóctonas en las pruebas de potencia y las cuales habían cumplido con estos controles en su país de origen. Es importante destacar, que aunque la cepa EE VE02 EL PAO y otras cepas de VEEE autóctonas mostraron variación genética [6, 12, 13]; en las pruebas de potencia para evaluar la eficacia de la vacuna, los anticuerpos inducidos neutralizaron *in vitro* y protegieron en el desafío a cobayos frente a estas cepas virales vivas.

La prueba de potencia por vía intraperitoneal fue satisfactoria, todos los cobayos vacunados para cada formulación no presentaron signos de encefalitis y tuvieron títulos de anticuerpos protectores IH ≥ 20 (Cuadro 2). En el grupo control sin vacunar, el 60% presentaron síntomas neurológicos de encefalitis (irritación motora) entre los 10 d y no presentaron anticuerpos, mientras que el 40% no evidenció síntomas y presentaron títulos de anticuerpos protectores IH ≥ 20 . Este último resultado es normal, dado que en una infección natural, ciertos animales desarrollan anticuerpos y controlan la infección [28]. Esta prueba de potencia por vía intraperitoneal se realizó con el objeto de comprobar que esta vía de inoculación para el desafío también es efectiva, y mostró ser eficaz, por lo que es una alternativa válida para realizar pruebas de desafío, sin necesidad de someter a los cobayos por el trauma de realizarles un orificio intracraneal como lo indica la prueba de potencia de acuerdo a Scherer *et al.* [16] y al Código de Regulaciones Federales [17]. En tal sentido, es una prueba de potencia más fácil de realizar y menos traumática en animales de laboratorio y solo habría que observar a los cobayos por más tiempo de los 10 d post-desafío estipulados por estos autores, a modo de observar signos clínicos o la muerte por encefalitis en un mayor número de cobayos no vacunados. Otros autores como Pandia *et al.* [23], han utilizado satisfactoriamente la vía intraperitoneal en ratones para el desafío con cepas de VEEE.

En el estudio de viabilidad o estabilidad inmunológica realizada en cobayos a los 530 d post-elaboración de las formulaciones, todos los cobayos vacunados tuvieron títulos de anticuerpos IH ≥ 20 (Cuadro 3), de modo que se tuvo una respuesta positiva a la inmunización de acuerdo a Scherer *et al.* [16] y el Código de Regulaciones Federales [17]. Con la formulación I, el porcentaje de respuesta positiva a la vacunación con títulos de anticuerpos IH ≥ 20 fue de 100%, los títulos estuvieron entre 20 y 80, y el 30% presentó reactividad cruzada con el VEEV. Con la formulación II el porcentaje de respuesta positiva a la vacunación con títulos de anticuerpos IH ≥ 40 fue de 100%, los títulos estuvieron entre 40 y 80, y el 30% presentó reactividad cruzada con el VEEV. Con la formulación III, el porcentaje de respuesta positiva a la vacunación con títulos de anticuerpos IH ≥ 40 fue de 100%, los títulos estuvieron entre 40 y ≥ 160 , y el 40% presentó reactividad cruzada

Cuadro 2. Prueba de potencia por vía intraperitoneal. Títulos de anticuerpos (Ac) inhibidores de la hemoaglutinación contra el virus de la encefalitis equina del este (VEEE) y virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) en cobayos vacunados y no vacunados con 10 días post-desafío con la cepa patógena EE VE96 MLLANO

Cobayo 250-300 g PV	Formulación I		Formulación II		Formulación III		No Vacunados	
	VEEE	VEEV	VEEE	VEEV	VEEE	VEEV	VEEE	VEEV
1	20	20	80	0	160	40	0	0
2	40	20	80	20	160	0	0	0
3	40	20	40	0	80	0	160	0
4	80	0	40	0	160	0	160	40
5	40	0	80	20	160	20	0	0
6	40	0	40	20	80	0	160	20
7	80	0	80	0	40	20	160	40
8	80	0	40	0	80	20	0	0
9	40	0	80	0	40	0	0	0
10	20	0	80	0	80	0	0	0
Promedio de Título de Ac a VEEE	48		64		104		64	
Detección de Ac (P>0,05)								
Título de Ac (P<0,01)								

con el VEEV. El análisis de Kruskal Wallis, para los resultados de la prueba de viabilidad, mostró que no hubo diferencias significativas en la detección de anticuerpos entre ellas ($P>0,05$), aunque si hubo diferencias altamente significativas en los títulos de anticuerpos, siendo la III la que presentó mayores títulos seguida de la II y I, respectivamente ($P<0,01$). Estos resultados evidencian que las formulaciones almacenadas a 4°C durante 530 d mantuvieron su poder inmunogénico. Por lo tanto, se detectaron títulos de anticuerpos protectores con la vacuna recién elaborada (90 d post-elaboración) y después de 530 d de almacenamiento (Cuadros 1 y 3).

La estabilidad inmunológica de las vacunas es un requisito importante para todo compuesto que va a ser almacenado por largos períodos [15]. De acuerdo a Scherer *et al.* [16] el período de validez de las vacunas clásicas inactivadas con formalina y adyuvante hidróxido de aluminio es de un año después de la inactivación y de acuerdo Abaracón *et al.* [15] el de las vacunas inactivadas con BEI y adyuvante incompleto de Freund es de dos años, mientras las emulsiones permanezcan estables.

Por otra parte, los Alfavirus están relacionados antigénicamente, debido a que comparten antígenos comunes y los virus muestran reacciones cruzadas en las pruebas serológicas [29]. En este estudio, se

observó reacción cruzada con el VEEV en los cobayos vacunados. Además, Walton *et al.* [30], demostraron que los anticuerpos heterólogos en animales vacunados para otros Alfavirus proporcionan algún grado de protección cruzada.

Las pruebas de potencia y viabilidad fueron satisfactorias, indicando que las formulaciones protegieron contra el VEEE y confirmaron su estabilidad inmunológica durante 530 d. Los títulos de anticuerpos por IH con las mismas vacunas después de 530 d de almacenamiento fueron más elevados con respecto a los 90 d post-elaboración. Este resultado se debe a que a los 90 d post-elaboración se aplicó una dosis de vacuna y se realizaron diluciones de los sueros hasta 1/40, mientras que a los 530 d post-elaboración se aplicaron dos dosis y se realizaron diluciones de los sueros hasta 1/160, pudiendo detectarse anticuerpos hasta esta dilución, lo que indica que con la revacunación se potenció la respuesta inmune y no se observó deterioro del poder inmunogénico.

Los sueros de los cobayos reaccionaron contra todas las cepas de virus utilizadas como antígeno, especialmente con las cepas de VEEE, donde se obtuvieron títulos de anticuerpos $SN \geq 40$ y por IH ≥ 20 a los 21 d post-vacunación. Estos resultados en la SN e IH son pruebas indirectas de desafío de acuerdo a Abaracón *et al.* [15]. De modo que los anticuerpos

Cuadro 3. Prueba de viabilidad a los 530 días post-elaboración de la vacuna. Títulos de anticuerpos (Ac) inhibidores de la hemoaglutinación contra el virus de la encefalitis equina del este (VEEE) y virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) en cobayos a los 28 días post-vacunación (2 dosis de 1 mL con 7 d de intervalo)

Cobayo	Formulación I		Formulación II		Formulación III		No Vacunados		
	250-300 g PV	VEEE	VEEV	VEEE	VEEV	VEEE	VEEV	VEEE	VEEV
1		20	20	80	0	80	0	0	0
2		40	0	80	20	40	0	0	0
3		40	20	40	0	160	40	0	0
4		80	0	80	20	160	0	0	0
5		40	20	40	0	160	20	0	0
6		40	0	40	20	80	0	0	0
7		80	0	80	0	40	20	0	0
8		80	0	40	0	80	20	0	0
9		40	0	80	0	40	0	0	0
10		20	0	80	0	80	0	0	0
Promedio de Título de Ac a VEEE		48		64		92		0	
Detección de Ac (P>0,05)									
Título de Ac (P<0,01)									

protegeron contra las cepas de VEEE estudiadas. La vacuna inactivada oleosa, al estar constituida con una cepa autóctona tuvo como ventaja un alto poder inmunogénico contra otras cepas de VEEE venezolanas. Los hallazgos evidencian la importancia de utilizar en la preparación de vacunas, una cepa de virus representativa de la realidad epizootiológica de la zona donde la vacuna va a ser aplicada. Abaracón *et al.* [15], señalaron la importancia que tiene una cepa viral a ser usada como inmunógeno en una vacuna, la cual debe ser inmunológicamente eficiente y representativa del momento epizootiológico del área donde será usada y que periódicamente se debe verificar que las cepas de virus contenidas en las vacunas den protección real frente a las cepas actuantes en el campo. Por consiguiente, la selección de la cepa más inmunogénica es de vital importancia para la preparación de una vacuna satisfactoria.

CONCLUSIONES

La vacuna fue inocua, potente e indujo anticuerpos a los 21 d post-vacunación con una dosis en cobayos, además fue eficaz en el desafío e inmunológicamente estable durante 530 d de almacenamiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a José Blanco del laboratorio de Enfermedades Vesiculares, Sanidad Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (CENIAP-INIA), a Irineo Matheus, Enrique Pérez y Zenobia Vargas del laboratorio de Arbovirus (CENIAP-INIA) por la colaboración técnica prestada. A Gladys Medina por su apoyo en la utilización de las instalaciones del Laboratorio de Arbovirus (CENIAP-INIA). Al Centro de Microbiología y Biología Celular, Servicio de Microscopía Electrónica y Departamento de Fotografía Científica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

REFERENCIAS

1. Paessler S, Weaver SC. Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine*. 2009; (Suppl. 4): D80-5.
2. Powers AM, Roehrig JT. Alphaviruses. *Methods Mol Biol*. 2011; 665:17-38.
3. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 2013. Encefalitis equina del este. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/encefalitis-equina-del-este>. [Consulta: 10 de febrero 2014].

4. Aguilar PV, Leung LW, Wang E, Weaver SC, Basler CF. A five-amino-acid deletion of the eastern equine encephalitis virus capsid protein attenuates replication in mammalian systems but not in mosquito cells. *J Virol.* 2008; 82(14):6972-83.
5. Siger, JDe. Encefalitis equinas. En: Jornadas sobre Encefalitis Equina. Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Aragua, Maracay, Venezuela. 1995; p. 1-17.
6. González MC, Ruíz J, Rivero J, Bermúdez V, Herrera F. Caracterización del virus de la encefalitis equina del este mediante la transcriptasa reversa reacción en cadena de la polimerasa y el análisis del polimorfismo de la conformación de cadenas sencillas. *Rev Fac Cs Vets.* 2009; 50(2):77-84.
7. Brault, AC, Power AM, Chavez CL, López R, Chacón M, Gutiérrez LF, *et al.* Genetic and antigenic diversity among eastern equine encephalitis viruses from north, central and south America. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61(4):579-68.
8. Aguilar PV, Robich RM, Turell MJ, O'Guinn ML, Klein TA, Huaman A, *et al.* Endemic eastern equine encephalitis in the Amazon region of Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76(2):293-8.
9. Pauvolid-Correa A, Tavares FN, Costa EV, Burlandy FM, Murta M, Pellegrin AO, *et al.* Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolandia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Brasil.* 2010; 105(6):829-33.
10. Siger JDe, Pulgar E, Medina G, Matheus I, Pérez BM. Encefalitis equina del este, cepas suramericanas I: Preparación de una vacuna inactivada y su evaluación en animales de laboratorio. *Rev Cientif Fac Cs Vets.* 2004; 14(6):559-67.
11. Gould EA, Coutard B, Malet H, Morin B, Jamal S, Weaver SC, *et al.* Understanding the alphavirus: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Res.* 2010; 87(2):111-24.
12. González MC. Preparación y evaluación de una vacuna inactivada contra el virus de encefalitis equina del este a partir de una cepa autóctona venezolana. Tesis de Doctorado, Postgrado en Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad, Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 2010; p. 55-126.
13. González MC, Herrera F, Correia H, Ruíz J. Análisis filogenético de cepas venezolanas del virus de la encefalitis equina del este. *Rev Fac Cs Vets.* 2012; 53(1):49-60.
14. Strizki JM, Repik PM. Differential reactivity of immune sera from human vaccines with field strains of eastern equine encephalitis virus. *Am. J Trop Med Hyg.* 1995; 53(5):564-70.
15. Abaracón D, Fernández A, Astudillo V, Barahona H, Olascoaga RC, Centeno ER, *et al.* Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra fiebre aftosa. Programa de adiestramiento en salud animal para América Latina, Centro Panamericano de fiebre Aftosa. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud y Banco Latinoamericano de Desarrollo. Rio de Janeiro, Brasil. 1987; p. 158-94.
16. Scherer WF, Mackenzie RB, Eddy GA, Cole FE, Pedersen CF, Spertzel RH, *et al.* Recomendaciones para la producción de vacunas contra las encefalitis equinas. En: Conferencia Internacional Sobre Vacunas Contra las Encefalitis Equinas. Centro Panamericano de Zoonosis, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Maracay, Venezuela. 1974; p. 15-25.
17. Code of Federal Regulations. Animals and animal products. Killed virus vaccine. Special Edition of The Federal Register National Archives and Records Administration, E. U. A. 1998; p. 590-607.
18. Mohanty SB, Dutta SK. Virología veterinaria. 1a ed., Nueva Editorial Interamericana S. A. México, D. F. 1983; p. 24 y 82.
19. Centers for Disease Control and Prevention. Eastern Equine Encephalitis. Disponible en: <http://www.cdc.gov/EasternEquineEncephalitis/tech/virus.html>. [Consulta: 15 de febrero 2014]. 2010.
20. Batalla CD. Vacunas contra la encefalitis equina venezolana. En: Encefalitis Equina por Arbovirus. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, SAGAR, México D. F. 1999; p. 273-93.
21. Roy CJ, Adams AP, Wang E, Leal G, Seymour RL, Sivasubramani SK, *et al.* A chimeric simdbis-based vaccine protects cynomolgus macaques against a lethal aerosol challenge of eastern equine encephalitis virus. *Vaccine*, 2013; 31(11):1464-70.
22. Pandia J, Gorchakov R, Wang E, Lealy G, Weaver SC. A vaccine candidate for eastern equine encephalitis virus based on IRES-mediated attenuation. *Vaccine.* 2012; 30(7):1276-82.
23. Tizard I. Inmunología Veterinaria. 5^{ta} ed., Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores S. A., México D.F. 1995; p. 275-313.
24. Bahnemann HG, Mesquita JA. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. *Bol Cent Pana Fiebre Aftosa.* 1987; 53:19-24.
25. Bahnemann HG. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch Virol.* 1975; 47(1):47-56.

26. Yu S, Aaskov JG. Development of a candidate vaccine against Ross River virus infection. *Vaccine*. 1994; 12(12):1118-24.
27. Fort Dodge Animal Health. Encephalomyelitis vaccine, eastern, western & venezuelan, killed virus, tetanus toxoid (Triple ET Innovator). Division of American Home Products Corporation, USA. 2001; p. 1-7.
28. Madigan MT, Martinko JM. Brock Biology of Microorganisms. 11a ed., Pearson Prentice Hall, United States America. 2006; p. 752-54.
29. Brooks GF, Carroll KG, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawestz, Melnick *et al.* Microbiología Médica. 25a ed., McGraw-Hill Interamericana Editores S. A., México D.F. 2011; p. 517-22.
30. Walton TE, Jochim MM, Barber TL, Thompson LH. Cross-protective immunity between equine encephalomyelitis viruses in equids. *Am J Vet Res*. 1989; 50(9):1442-6.