

Respuesta de anticuerpos contra Encefalitis Equina Venezolana en equidos vacunados con la vacuna a virus vivo modificado (TC-83).

*Slavia Ryder**, *Luis Ruiz-Padilla***, *Linda Blütz-Dorfman****, *Armando Soto Escalona**.

*Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo 4001-A, Venezuela, **Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Centro-Occidental, Barquisimeto, Venezuela y ***Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Resumen. A raíz de la epidemia de Encefalitis equina Venezolana (EEV) de 1973, se utilizó por primera vez en Venezuela, la vacuna a virus vivo modificado (TC-83). Para evaluar la efectividad de la misma, se estudiaron 49 pares de sueros de équidos, sin antecedentes de vacunación o enfermedad, que fueron vacunados con la vacuna TC-83. Se comprobó que 28 de estos animales poseían anticuerpos contra EEV en el suero prevacunación. De los 21 restantes, sin anticuerpos neutralizantes ni inhibidores de la hemaglutinación, 17 convirtieron al cabo de seis semanas después de la vacunación. A pesar de ser una muestra muy pequeña, creemos que estos resultados apoyan la tesis sustentada por algunos investigadores sobre la efectividad de la vacuna a virus vivo atenuado TC-83, contra Encefalitis equina Venezolana. Asimismo sustentamos la idea de que la vacunación efectuada a tiempo en las zonas en peligro durante 1973, contribuyó a detener la extensión de la epidemia.

Evaluation of the attenuated Venezuelan equine encephalitis vaccine (TC-83) in equidae.

Invest Clin 19(3):116-123, 1978.

Abstract. During an epidemic of Venezuelan equine encephalitis (VEE) in Venezuela in 1973, the TC-83 attenuated vaccine was used to control the dissemination of the epizootic. Being the first time that the vaccine had been introduced in Venezuela, an evaluation was initiated. Forty nine equidae were bled and vaccinated and six weeks later sera postvaccination were

taken. NT antibodies to VEE was detected in 28 of the prevaccination sera. Vaccination stimulated the production of antibody detectable with the plaque neutralization test in 81% of the equidae free of NT antibody in the prevaccination sera.

INTRODUCCION

Desde 1938, cuando Kubes y Ríos (5) aislan por primera vez el virus de la encefalitis equina venezolana (EEV) a partir del cerebro de un caballo muerto con síntomas de encefalitis, la enfermedad ha causado gran número de casos y muertes en équidos y humanos en Venezuela (1).

Para su control se han venido utilizando en el país vacunas a virus inactivado, producidas en laboratorios locales o extranjeros. Sin embargo, como esta vacunación no alcanza a animales que deambulan libremente carentes de dueño, como sucede en la Guajira, las epizootias y epidemias aparecen periódicamente cuando por modificaciones ecológicas aumentan el número de vectores y hay una población de équidos y humanos susceptibles (8).

En 1973, con ocasión de la epidemia de EEV que azotara nuevamente a la Guajira venezolana, el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social de Venezuela, adquirió de laboratorios norteamericanos, la vacuna a virus vivo modificado (cepa TC-83), y comisionó al Ministerio de Agricultura y Cría para utilizarla en la inmunización de équidos con el objeto de detener la extensión de la epizootia (7).

Debido a que era la primera vez que esta vacuna era usada en Vene-

zuela, nos propusimos evaluar la efectividad de la misma, en cuanto a su poder inmunizante, en una población de équidos.

MATERIAL Y METODOS

Se seleccionó para el presente estudio, la región que rodea a la población de Curimagua, Distrito Petit del Estado Falcón. Esta es una zona alta a 1.400 mts. sobre el nivel del mar, temperatura media de 22°C, sin un determinado período de lluvias, y en donde no se conoce que haya habido actividad viral anteriormente.

En el mes de agosto de 1974, cuarenta y nueve équidos (7 caballos, 1 mulo y 42 asnos), escogidos al azar, comprendidos entre las edades de 9 meses y 12 años, con aparente buena salud y sin historia previa de vacunación contra EEV, fueron usados en el estudio.

Los équidos fueron sangrados previamente y posteriormente vacunados subcutáneamente en la tabla del cuello con 1 cc. de la vacuna TC-83, cuyo título era no menos de $10^{5.2}$ DL50/ml (R. Walder, comunicación personal). La vacuna, conservada en frío, fue reconstituída en el mismo lugar y utilizada inmediatamente. Todos los animales fueron vacunados al mismo tiempo. El virus vacunal proviene de la cepa Trinidad, burro No 1, de encefalomielititis equina venezolana, la cual fue

pasada 83 veces en cultivo de células embrionarias de corazón de cobayo para atenuar su virulencia (2, 9).

Seis semanas después de haber sido vacunados, se tomaron las segundas muestras de suero, las cuales son la base del presente trabajo. Durante ese lapso de tiempo los animales no habían presentado síntoma alguno de enfermedad.

Pruebas serológicas.- Los 49 pares de sueros fueron probados mediante el método de inhibición de la hemaglutinación (IH), siguiendo la clásica técnica de Clarke y Casals (3), modificada para micrométodo. Los sueros fueron adsorbidos con caolín para remover inhibidores no específicos, y eritrocitos de ganso, y se usaron en diluciones de 1:1280. El antígeno proviene de cerebro de ratón lactante inoculados con virus de la EEV (P846, cepa Guajira), y extraído con sacarosa-acetona.

La presencia de anticuerpos neutralizantes (NT) se determinó utilizando el micrométodo de inhibición de placas bajo capa de agar (4), usando cultivos de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) en paneles plásticos desechables (Linbro 96CV-TC). Los sueros fueron diluidos 1:8 e inactivados a 56°C por 30 minutos. La cepa de virus utilizada fue la P846, cepa Guajira, cuyo título era de $10^{8.3}$ ufp/ml en cultivo de FEP. Partes iguales de suero inactivado y virus diluido $10^{5.3}$ fueron incubados a 37°C por 1 hora. 0.1 ml de la mezcla fue inoculada por duplicado en las monocapas de FEP,

incubadas por 1 hora a 37°C, y luego se añadió el agar. El virus control tuvo un promedio de 18 placas. Los sueros con 6 ó menos placas (80% reducción) fueron considerados positivos.

RESULTADOS

De los 49 sueros pre-vacunación, 28 poseían anticuerpos NT e IH contra EEV. En la Tabla I hemos agrupado a aquellos animales que no poseían anticuerpos NT ó IH en sus sueros antes de la vacunación. De los 21 animales que componen este grupo, 18 convirtieron mediante la prueba de IH y 17 presentaron títulos NT a las seis semanas después de la vacunación, lo cual representa un 81% de positividad.

En la Tabla II están los animales que poseían tanto anticuerpos NT como IH en el suero prevacunación. Podemos observar que los títulos IH se conservaron, así como los NT.

Al resto de los sueros sólo se les pudo practicar la prueba de IH, y no van a ser considerados en este trabajo.

DISCUSION

Hay que hacer notar, que un 57% de los animales estudiados tenían anticuerpos NT previos a la vacunación. Aún cuando sus propietarios negaron que éstos hubiesen sido vacunados con anterioridad, es probable que los adquirieran de otros dueños sin conocer su historia de vacunaciones. Que los anticuerpos fueran debido a actividad endémica del virus en esa zona podría ser descartado, ya que todos los

TABLA I
ANIMALES SIN ANTICUERPOS NT O IH ANTES DE LA VACUNACION

Especie	Edad (Años)	Títulos IH		NT
		Pre	Post	
23 - Burro	9 meses	< 10	320	+
78 - Burro	7	< 10	320	+
21 - Caballo	10	< 10	160	+
51 - Burro	7	< 10	80	+
53 - Burro	5	< 10	80	+
65 - Caballo	10	< 10	80	+
31 - Burro	5	< 10	40	+
46 - Burro	7	< 10	40	+
64 - Burro	6	< 10	20	+
19 - Burro	7	< 10	20	+
22 - Caballo	9	< 10	20	+
30 - Burro	2	< 10	20	+
47 - Burro	7	< 10	20	-
62 - Burro	5	< 10	20	+
66 - Burro	8	< 10	20	+
80 - Burro	8	< 10	20	+
81 - Burro	6	< 10	10	+
96 - Burro	7	< 10	10	+
50 - Caballo	9	< 10	< 10	-
52 - Burro	7	< 10	< 10	-
86 - Burro	7	< 10	< 10	-

animales eran mayores de cuatro años. Nos inclinamos a pensar que estos animales provengan de zonas en donde haya habido actividad del virus, y hayan sobrevivido a la infección desarrollando anticuerpos.

El desarrollo de anticuerpos específicos e inmunidad contra el virus de la EEV después de la vacunación con la cepa TC-83, ha sido demostrada en trabajos de campo y experimentales hecho en Panamá, Costa Rica y Nicaragua (6, 11, 12).

En nuestro estudio, de los 21 animales que no poseían anticuerpos NT ó IH en el suero prevacunación, 17 desarrollaron títulos significativos de anticuerpos NT contra EEV después de ser vacunados, lo cual representa un 81% de positividad.

En la epidemia de EEV de 1973 se especuló acerca de que la extensión de la epidemia hacia el resto del Estado Zulia fue detenida por la vacunación. Si bien es cierto que las

TABLA II
ANIMALES CON ANTICUERPOS NT O IH ANTES DE LA VACUNACION

Especie	Edad (Años)	Titulos IH		NT
		Pre	Post	
40 - Caballo	8	320	320	+
42 - Burro	6	320	320	+
34 - Burro	5	160	160	+
70 - Burro	5	80	160	+
98 - Mulo	12	160	160	+
29 - Burro	4	80	80	+
48 - Burro	8	320	80	+
49 - Burro	5	80	80	+
71 - Burro	5	10	80	+
79 - Burro	10	40	80	+
108- Burro	10	160	80	+
76 - Burro	7	40	40	+
26 - Burro	4	40	20	+
84 - Burro	5	20	10	+
107- Burro	8	10	10	+
54 - Burro	6	10	10	+
55 - Burro	5	10	10	+

medidas de rociamiento de insecticidas que se emplearon para eliminar los vectores fueron tan intensas que por sí solas, creemos, fueron capaces de detener la propagación del virus, la vacunación de las llamadas "zonas en peligro" se comenzó tempranamente (7), y no se reportaron casos de encefalitis en el resto del Estado.

Creemos que los resultados de esta prueba corroboran los obtenidos en otras regiones de América en donde se ha estado evaluando la vacuna TC-83 (10). Reconocemos, sin embargo, que el ensayo fue hecho en una población muy pequeña

de animales, no se utilizaron controles y no se estudió el estado inmunológico de las mismas.

Consideramos que, si deseamos evaluar la efectividad de una vacunación con TC-83, es propio hacer énfasis en la necesidad de probar los sueros de los animales antes de la vacunación, para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes. Esto es importante sobre todo en regiones que, como Venezuela, es afectada periódicamente por esta enfermedad. Asimismo no se puede descartar que, aunque no se haya detectado la presencia del virus en determinada zona, los animales po-

sean anticuerpos; ya sea porque provengan de áreas en donde hubiere habido actividad viral o hayan sido vacunados previamente.

Otro punto importante es el hecho de que la vacuna, una vez reconstituída, debe mantenerse en frío y ser utilizada inmediatamente, ya que se pierde rápidamente su actividad inmunizadora.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. William F. Scherer por su valiosa ayuda en la preparación y discusión del manuscrito. A Germán Serrano y Pedro Rangel por su asistencia técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1- AVILAN-ROVIRA J.: El brote de encefalitis equina venezolana al norte del Estado Zulia a fines de 1962. *Rev Vlna SAS* 29: 235- 321, 1964.
- 2- BERGE T.O., BANKS I.S., TIGERTT W.D.: Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in guinea-pig heart cells. *Am J Hyg* 73: 209-218, 1961.
- 3- CLARKE D.H., CASALS J.: Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 7: 561-573, 1958.
- 4- EARLEY E., PERALTA P.H., JOHNSON K.M.: A plaque neutralization method for arboviruses. *PSEBM* 125: 741-747, 1967.
- 5- KUBES V., RIOS F.A.: The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. *Science* 90: 20-21, 1939.
- 6- MARTIN D.H., EDDY G.A., SUDIA W.D., REEVES W.C., NEWHOUSE V.F., JOHNSON K.M.: An epidemiologic study of Venezuelan equine encephalomyelitis in Costa Rica, 1970. *Am J Epidemiol* 95: 565-578, 1972.
- 7- RUIZ-PADILLA L.A.: Vacunación anti-EEV con vacuna a virus vivo modificado TC-83. 1973-1974. Informe final presentado a la División de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Cría. Venezuela, 1975.
- 8- RYDER S.: Encefalitis equina venezolana. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad entre 1962-1971, en la Guajira venezolana. *Invest Clín* 13 (3): 91-141, 1972.
- 9- SPERTZEL R.O., KAHN D.E.: Safety and efficacy an attenuated Venezuelan equine encephalomyelitis vaccines for use in equidae. *J Amer Vet Med Ass* 159: 731-738, 1971.
- 10- SPERTZEL R.O., MICKINNEY R.W.: Venezuelan equine encephalomyelitis in Central America and Mexico. *Military Med* 137: 441-445, 1972.
- 11- WALTON T.E., ALVAREZ Jr O., BUCKWALTER R.M., JOHNSON K.M.: Experimental infection of horses with an attenuated Venezuelan equine encephalomyelitis vaccine (strain TC-83). *Inf Immun* 5: 750-756, 1972.
- 12- WALTON T.E., BRAUTIGAM F.E., FERRER J.A., JOHNSON K.M.: Epizootic Venezuelan equine encephalomyelitis in Central America. Disease patters and vaccine evaluation in Nicaragua, 1969-1970. *Amer J epidemiol* 95: 247-254, 1972.