

VACUNAS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA

M.V.Z. D. BATALLA CAMPERO

*Productora Nacional de Biológica Veterinarios. S.A.G.
México, D.F.*

I. Antecedentes	206
1. Encefalitis Equina Venezolana en México, durante los años de 1970-1974	206
2. Vacunas	207
II. Vacunas de virus inactivado	208
1. Recomendaciones para la producción de vacunas inactivadas contra las encefalitis equinas (EEE-EEO-EEV), origen embrión de pollo (2)	210
a) Definición del producto	210
b) Cepas patrón de virus (master seed)	210
c) Cepa stock	211
d) Cepa de producción	211
e) Tejido empleado	211
f) Técnica de inoculación	211
g) Tiempo de multiplicación	211
h) Cosecha y extracción del virus	211
i) Inactivación	212
j) Clarificación y centrifugación	212
k) Ajuste y dilución final	212
l) Formulación	212
ll) Control del producto final	213
m) Conservación, periodo de validez y volumen de la dosis	213
III. Vacunas de virus vivo	213
1. Origen de la cepa	213

2. Manejo y aplicación de la vacuna	216
a) Posología, uso, presentación y precauciones	217
Referencias	218

I. Antecedentes.

La Encefalitis Equina Venezolana (EEV) fue diagnosticada por primera vez en la frontera de Colombia y Venezuela hace 37 años, a partir de entonces se ha difundido a diversos países de Centro y Sudamérica produciendo brotes severos.

Durante el verano de 1969 ocurrió una epizootia de Encefalitis Equina Venezolana en Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua, de acuerdo con los reportes del Communicable Disease Center (CDC) (1); las primeras muertes de caballos se registraron en Guatemala en las costas del Pacífico, cerca de la frontera con El Salvador, posteriormente se difundió hacia el oeste, sobre las costas de Guatemala y hacia la frontera de Guatemala y El Salvador, durante el mes de agosto hubo mortalidad a lo largo de la costa de El Salvador, pero el número de muertes reportadas había disminuido grandemente en los municipios afectados en los cuales sólo había muertes esporádicas. Más tarde se recibieron informes de mortalidad entre los caballos localizados en la costa del Pacífico de la república de Honduras y al norte de Nicaragua.

1. *Encefalitis Equina Venezolana en México, durante los años de 1970-1974.* Se considera que fue una continuación del ocurrido en Guatemala, ya que a fines de agosto de 1969 se observaron casos de mortalidad de equinos en el municipio de Chicomuselo, Chiapas, que está en la frontera con Guatemala, sin embargo no fue sino hasta junio de 1970 cuando el brote se difundió en forma alarmante, iniciándose esta vez en los municipios de Concordia y Zocaltenango, después se observaron en Tuxtla Gutiérrez, Ocosocautla, Conaloapa y Trinitaria; de ahí el brote continuó por los márgenes del río Grijalva y después siguió por Cintalapa y por las poblaciones localizadas en las orillas de las carreteras circunvecinas, dirigiéndose rumbo al istmo de Tehuantepec, llegando hasta el Estado de Oaxaca y se reportaron algunos brotes en Guerrero y Michoacán (2, 3).

La Dirección General de Sanidad Animal de la Secretaría de Agricultura y Ganadería de México vacunó con vacuna de virus vivo modificado importado directamente de Fort Detrick EUA, a los

caballos localizados en las áreas de los brotes y formó cordones de vacunación entre los lugares en que aparecieron los brotes y las zonas libres de la enfermedad localizadas al norte. Uno de los cordones de vacunación más amplio fue el localizado en el istmo de Tehuantepec aproximadamente un mes antes de la aparición del brote en San Andrés Tuxtla, Veracruz. Después de este último brote, y todavía durante 1970, se vacunó una gran parte de los equinos del Estado de Veracruz. En ese año según reportes oficiales hubo una mortalidad de 6042 equinos. No obstante lo anterior, durante 1971 se presentaron brotes de EEV en Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León, Coahuila, Guanajuato, Querétaro, Zacatecas, Aguascalientes, Nayarit, Durango, Jalisco, Puebla y Sinaloa.

Posteriormente se vacunó a los caballos localizados en una amplia zona del territorio mexicano localizada en los límites de la frontera de los EUA, donde en 1970 no hubo casos de EEV y no obstante ello, en 1971, el brote pasó al Estado de Texas, donde el primer caso se presentó el 9 de julio de 1971, en un caballo de Brownsville; posteriormente hubo más casos y hasta septiembre de 1971 el CDC, reportó 88 aislamientos de virus en equinos y 88 casos en humanos confirmados por el laboratorio; además informó de un caso humano en Florida y otro en Arkansas. A partir del mes de julio de 1971 la campaña de vacunación se realizó con vacuna de virus vivo producido en México. En 1971 la mortalidad de equinos se elevó a 38 498. En 1972 se presentaron brotes en los Estados de Guerrero, Michoacán, Morelos, México, Colima, Jalisco, Nayarit, Sinaloa y sur de Sonora, con mortalidad de 4 769 equinos; el último brote que se presentó en el territorio nacional se reportó el 19 de septiembre de 1972 en las Islas Marías y desde entonces no se ha presentado un solo caso de EEV en México, aunque se han atendido varios cientos de reportes de animales enfermos resultando negativos al establecer el diagnóstico de laboratorio y se han venido realizando campañas de vacunación anual (2).

De la descripción anterior se pueden obtener dos conclusiones. La primera, que la enfermedad siempre que se trasladó a grandes distancias lo hizo dirigiéndose hacia la parte norte del continente americano. También se puede aseverar que los cordones de vacunación no evitaron que la epizootia se difundiera a lugares lejanos. Y que, después de una campaña bien planeada con revacunaciones anuales, fue posible controlar el brote.

2. *Vacunas.* Actualmente se conoce un gran número de vacunas contra la Encefalitis Equina Venezolana, preparadas siguiendo

distintas técnicas, pero se pueden dividir en dos grandes grupos: uno de vacunas inactivadas, entre las cuales existen diferentes métodos de producción y de inactivación. Algunas de ellas se elaboran a partir del embrión de pollo, otras en cultivos celulares, y en unas se usan cepas de campo originarias de los brotes actuales, en otras, semillas maestras debidamente clasificadas. En unos casos se inactivan con formalina en diferentes porcentajes y mantenidas a distintas temperaturas y en otros casos, mediante ionización o la aplicación de irradiación de rayos gamma.

El otro gran grupo de vacunas corresponde al de las elaboradas a partir de virus vivo modificado y atenuado, del cual hasta la fecha solamente se ha empleado la vacuna elaborada con la cepa TC-83.

II. Vacunas de virus inactivado

Las vacunas inactivadas se han venido empleando desde que la Encefalitis Equina Venezolana hizo su aparición en el continente, se-

CUADRO 1

ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA EN MÉXICO DURANTE LOS AÑOS DE 1970-1974

Año	Equinos muertos	Casos humanos	Defunciones en humanos	Equinos vacunados
1970	6042	-	-	428 365
1971	38 498	25 384	52	4480 953
1972	4769	25 753	41	1 584084
1973	-	-	-	2 326 383
1974	-	-	-	3 142726

gún lo señalan Siguer y *et al.* (4), siendo Kubes (5), Kubes y Ríos (6, 7), quienes dieron la pauta e iniciaron los trabajos de producción de vacunas.

La vacuna originalmente se preparaba según la técnica descrita por Kubes y Diamante (8), con el virus aislado por Kubes y Ríos, denominado V 1938, elaborando los primeros lotes de vacuna contra esta enfermedad a partir de suspensión de embrión de pollo al 10%, según método descrito por Shahn y Giltner (9) y Mitchell *et al.* en 1938 (10), con ligeras modificaciones en la forma siguiente:

Los embriones de 11 a 14 días son inoculados por vía alantoidea, muriendo a las 18 hrs postinoculación y el virus cosechado logra títulos promedios de 10^7 /ml. El virus stock se mantiene por pases múltiples en cerebro de ratón. Una mezcla de suspensiones de cerebros de los ratones inoculados se emplea para la inoculación de los embriones, y el virus cosechado en embriones, a su vez se titula en ratones por vía intracerebral, aceptándose los títulos que oscilen entre 10^7 y 10^{10} /ml.

Después de la inactivación con formalina al 4% y clarificación, la antigenicidad y potencia de la vacuna es determinada por prueba de seroprotección en ratones [comunicación personal en Kubes, citada por Gilgard (11)].

Desde entonces hasta la fecha se han venido ensayando diferentes modificaciones al método de producción de las vacunas inactivadas de origen de embrión de pollo, destacando los trabajos de Randall *et al* (12) y Smith *et al.* (13) en los que se describen técnicas de preparación y purificación de las vacunas antes descritas y el de Randall *et al.* (14) para el uso de dichas vacunas en la inmunización de personas que trabajan en laboratorios de Arbovirus.

Se tiene un gran número de reportes de Venezuela y Colombia, en donde el uso de la vacuna mal inactivada con formalina ha sido la fuente para desencadenar brotes en equinos y humanos de Encefalitis Equina Venezolana, que coinciden con los estudios de Sutton (15) y Smith (16), que señalan que si la inactivación se hace con formalina al 4 por mil, quedan partículas de virus vivo, con las cuales se pueden producir casos de enfermedad en sujetos vacunados y si la inactivación se hace elevando la formalina al 4%, la vacuna resulta inocua, pero con un porcentaje de protección muy bajo y por un periodo corto de tiempo, después de dos aplicaciones con intervalos de 10 días.

Posteriormente debido a esta serie de problemas, se han desarrollado otra serie de técnicas de producción de vacunas, tanto en embrión de pollo como en cultivos celulares, pero inactivadas por irradiación de rayos gamma según técnicas descritas por Polley (17), Reitman *et al.* (18) y Gruber (19) con mejores resultados en su uso en humanos como lo señalan, Reitman y Tonik (20), y Gruber (21).

En los últimos años, varios investigadores han trabajado para lograr vacunas inactivadas de EEV de mayor calidad, desarrollando técnicas de preparación como las de Musgay *et al.* (22) y Cole *et al.* (23, 24), en las cuales se emplean cultivos celulares o

incluso utilizan una cepa atenuada para tratar de evitar las complicaciones secundarias, postvacunales, pero hasta al fecha no se han logrado mejorar los resultados en cuanto a los controles de inocuidad y potencia, cosa que no sucede con las vacunas inactivadas contra la Encefalitis Equina del Este (EEE) y Encefalitis Equina del Oeste (EEO), en las cuales sí se ha logrado mejorar los controles, insistiendo en las pruebas de inocuidad y potencia (25, 26).

En síntesis, desde que la Encefalitis Equina Venezolana se presentó en el continente, se han venido elaborando y utilizando vacunas inactivadas para tratar de controlar la enfermedad, pero sin que hasta la fecha existan los requerimientos de norma formulados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos o de algún gobierno, con los consiguientes resultados negativos, señalados anteriormente.

No fue sino hasta el 11 de agosto de 1974 que, por iniciativa de la Oficina Sanitaria Panamericana de la Organización Mundial de la Salud, se reunieron en Maracay, Venezuela, los expertos en producción de vacuna contra EEV, de los distintos países de América y se dictaron las recomendaciones que a continuación se indican, para tratar de resolver el grave problema de la falta de control en la producción de las vacunas inactivadas (27).

1. Recomendaciones para la producción de vacunas inactivadas contra las encefalitis equinas (EEE - EEO - EEV), origen embrión de pollo (2).

a) Definición del producto

Es una suspensión de virus de la encefalitis equina, cultivado en embriones de pollo e inactivado por métodos físicos y químicos. Este producto está indicado para la inmunización activa contra las encefalitis equinas del Este, Oeste y/o Venezolana.

b) Cepas patrón de virus (master seed)

Virus de la encefalitis equina tipificados por el laboratorio de referencia y apto para la producción de vacuna a nivel industrial.

Esta cepa debe ser mantenida liofilizada o congelada a - 70° C., después de haberle dado uno o dos pases o los indicados por el laboratorio de referencia.

c) *Cepa stock*

Se prepara a partir de la cepa patrón con número limitado de pases (7 a 10 o los indicados por el centro de referencia de acuerdo a la cepa), mientras se adapta al embrión del pollo, preferiblemente libre de patógenos específicos (SPF); deberá estar libre de: bacterias, hongos, micoplasmas y virus. Poseerá un título no inferior a los DL50% ml en embriones y se conservará en congelación preferiblemente a -70° C.

d) *Cepa de producción*

Se prepara a partir de cepa stock por dilución en vehículo apropiado (solución salina buferada) de acuerdo con el título, hasta obtener una dilución que contenga 10^5 DL50/ml (pH 7.2-7.6).

e) *Tejido empleado*

Embriones de pollo de 10-12 días. Previamente observados al ovoscopio.

f) *Técnica de inoculación*

Cada embrión recibirá por vía alantoidea 0.1 ml de la semilla de producción, es decir 10^4 DL50.

g) *Tiempo de multiplicación*

Incubación a 37° C., hasta que mueran el 95-100% de los embriones, descontándose aquellos que mueran antes de las 12 horas postinoculación.

h) *Cosecha y extracción del virus*

Sólo se recolectarán los embriones que presenten señales de haber muerto por acción viral y se recogerán en recipientes estériles y refrigerados. Se deberá cosechar el embrión sin líquidos ni membranas anexas.

Extracción del virus

Molienda o trituración. Debe efectuarse en frío hasta obtener una suspensión homogénea y fina.

Adición de buffer de fosfatos de pH 7.2-7.6 en partes iguales (V/ V). Para la preparación de vacunas mono o polivalentes se procederá hacer las suspensiones de cada tipo de virus por separado y en la misma proporción.

Toma de muestras para el título del virus (en ratones lactantes de tres días, inoculando cada ratón con 0.02 ml por vía IC. El cálculo final se hará por el método de Reed y Muench).

i) Inactivación

El tiempo, temperatura, agitación y tipo de inactivante, serán determinados en la curva de inactivación que debe realizarse a la cepa de trabajo. En caso de que la inactivación se haga por adición de formol puro (40% formaldehído) debe quedar a una concentración final del 0.4%.

Antes de agregar la formalina ésta debe ser diluida en solución salina bufferada, (pH 7.2-7.6). La agitación debe ser constante, mantenida en la oscuridad. La inactivación debe ser hecha a temperatura de 10 a 22°C., por un periodo no menor de 72 horas.

j) Clarificación y centrifugación

El producto debe clarificarse para eliminar el resto de sustancias celulares y mientras se obtienen datos que permiten desarrollar un procedimiento óptimo para este objetivo se recomienda la clarificación y posterior centrifugación.

k) Ajuste y dilución final

Se hará con solución salina bufferada, de acuerdo con el título de la cosecha, de tal forma que una dosis del producto final contenga como mínimo $10^{7.5}$ DL50 en ratón lactante por cada tipo de virus.

l) Formulación

En caso de vacunas polivalentes se procederá a formularlas de tal manera que el contenido de cada uno de los virus cumpla con lo especificado en el punto No. 12.

II) *Control del producto final*

Se realizan pruebas de caracterización, pureza, inocuidad en ratón lactante, inocuidad en equinos inoculados con 200 ml de vacuna y la potencia en cuyes.

m) *Conservación, periodo de validez y volumen de la dosis*

En refrigeración de 4-8° C.

Periodo de validez

Un año a partir de la inactivación.

Volumen de la dosis

Para vacuna intradérmica dos dosis de 1 ml con un intervalo de 7 a 14 días.

Para vacuna subcutánea dos dosis de 5 ml con un intervalo de 7 a 14 días.

III. Vacunas de virus vivo

Hasta la fecha la única vacuna de virus vivo modificado que se conoce es la elaborada con la cepa TC-83, que según estudios experimentales de Mc. Kinney (28), con una sola aplicación protege a los equinos por más de dos años. Dicha vacuna se ha venido utilizando con excelentes resultados en algunos brotes presentados en Colombia, Perú, Ecuador, Guatemala, Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, México y Estados Unidos.

1. *Origen de la cepa*

La cepa originalmente fue asilada por Randall, en cuyes a partir del cerebro de un burro que murió de Encefalitis Equina Venezolana, durante un brote en la isla Trinidad en 1943; posteriormente se le dieron 13 pases en embrión de pollo y se hicieron estudios con los que se demostró que el virus de la EEV podría ser adaptado para crecer en una variedad de células de cuyes (29). Las células de corazón de cuyes fueron seleccionadas para este estudio. Se hicieron pases en serie del virus a intervalos de 3 a 5 generaciones por pase. Los fluidos cosechados se probaron en ratones encontrando que en el pase No. 26 un pequeño grupo de ratones sobrevivió a la inoculación,

aumentando progresivamente el número de ratones que sobrevivía conforme se elevaba el nivel del pase. Después de 45 pases se logró la completa atenuación del virus cosechado de los cultivos celulares para el ratón inoculado tanto por la vía intraperitoneal como intracerebral y observando en equinos, que el virus había perdido la capacidad de producir la enfermedad, pero que después de la inoculación, incrementaba las defensas específicas del organismo contra la EEV (30).

Para entonces se elaboraron varios lotes de vacuna de los pases 50, 70 y 90, encontrando que era una vacuna efectiva.

Con el propósito de purificar el virus, el pase No. 70 se le dio en fibroblastos de embrión de pollo, seleccionando para ello 12 placas, de las cuales 9 eran patógenas y 3 no. Una de las tres no patógenas se utilizó como semilla para preparar un lote de vacuna en células de corazón de embrión de cuye (pase 80), se le dieron 2 pases más hasta llegar al pase 82 para ser empleado como semilla para producción y el 83 como la vacuna proporcionada por la National Drug Company, para combatir los brotes de 1969-1970 en Colombia, Ecuador, Panamá y México.

Posteriormente se proporcionó el protocolo de producción editado por la National Drug Company, USA, Army Medical Research and Development Comand at Fort Detrick Maryland y el pase 83 a los laboratorios productores de la vacuna, Jensen Salsbey Laboratories (Jen Sal., EUA), Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (SAG, México), Empresa Colombiana de Productos Veterinarios (VECOL), para que sea empleada como semilla madre y preparar la semilla maestra o de trabajo con el pase 84, encontrando que la vacuna utilizada actualmente corresponde al pase 85, elaborado de una manera estándar y siguiendo dicho protocolo.

Una vez desarrollada la vacuna se han hecho un gran número de pruebas para demostrar las bondades en el uso y aplicación de la misma; los primeros trabajos fueron los de Mc. Kinney (28), Alevizatos (32) y Feigin (33) para su uso en humanos, y los de Spertzel y Kahn (34), Walton *et al.* (35) y Gochenour *et al.* (36), para su uso en equinos, en los que encontraron que la vacuna protege, desarrollando en los animales vacunados un considerable título de anticuerpos seroneutralizantes, inhibidores de la hemoaglutinación y fijadores de complemento, e incluso resisten el desafío con una cepa de campo 24 meses después de vacunados.

Otros estudios más recientes como los de Walton y Johnson (37) demuestran que es posible detectar anticuerpos neutralizantes en ca-

ballos vacunados después de 20 y 30 meses. Jochmin *et al.* (38), demostraron que el uso de la vacuna atenuada TC-83 en diferentes concentraciones no produce signos severos de enfermedad en animales vacunados, dando un margen de seguridad en el uso y que resisten el desafío contra cepas virulentas.

Simultáneamente se han desarrollado una serie de trabajos, debido a las inquietudes de los investigadores en determinar qué sucedería en la naturaleza si se vacunan caballos con una cepa atenuada, la cual se reproduce en el organismo de los equinos produciendo una ligera viremia; era necesario conocer si el virus presente en la sangre de los caballos vacunados era capaz de infectar mosquitos, y qué sucedería si se hacen pases regresivos en caballos, para ver si el virus revertía a la patogenicidad destacando entre otros los de Henderson *et al.* (39) y Sudia (40), en los que demostraron por un lado que la respuesta clínica posterior a la inoculación es notablemente inferior a la producida por las cepas de campo y por otro lado que la viremia presente no es capaz de infectar mosquitos.

Yercado y Batalla (41), Luedke *et al.* (42), demostraron que el virus vacunal TC83 no era capaz de revertir a la patogenicidad después de 5 pases regresivos en caballos, además de que el título de viremia inducido está muy por debajo de lo que señala la literatura como necesario para que se infecten mosquitos en la naturaleza.

Monlux *et al.* (43) demostraron que no hubo lesiones microscópicas irreversibles en el sistema nervioso central de 45 caballos vacunados con TC83 entre 5 y 49 días después de las vacunaciones: Monlux *et al.* (44) demostraron también que no hubo lesiones microscópicas en el sistema nervioso central de los caballos utilizados por Mercado y por Luedke en el estudio de irreversión a la patogenicidad. Por último Taylor y Buff (45) demostraron en un experimento realizado con 27 ponies que no era posible la transmisión del virus vacunal TC83 en la naturaleza, ni por caballo-caballo, ni por caballo-mosquito-caballo.

Para que se permitiera el uso de la vacuna producida en México, fueron necesarias varias pruebas en condiciones de laboratorio, como lo señalan Batalla *et al.* (46) y otras en condiciones de campo señalados por Batalla y Mercado (47).

Debido a un gran número de problemas que se presentaron en el manejo, uso y conservación de la vacuna en condiciones de campo, fue necesario realizar una serie de estudios encaminados a modificar la fórmula del diluyente, ya que el recomendado (31) con-

sistía en una solución balanceada de Hank, y por lo tanto un medio de cultivo muy rico para el desarrollo de gérmenes y de difícil elaboración, hasta encontrar que con solución salina bufferada era posible mantener el virus viable una vez reconstituida la vacuna de manera similar que al emplear la solución balanceada de Hank (48). Por otro lado las recomendaciones de la National Drug Company establecían que la vacuna liofilizada se debería mantener en congelación a -20°C , cosa que es muy difícil o casi imposible en las condiciones del campo de México; fue entonces necesario encaminar varios estudios hasta encontrar un estabilizador que agregado al producto antes de liofilizar pudiera mantener viable el virus una vez desecado por un largo periodo de tiempo en condiciones de refrigeración a 4°C (49, 50) y posteriormente determinar la fecha de caducidad de la vacuna con ese estabilizador y mantenida en refrigeración.

Como puede observarse en la situación detallada anteriormente y en la revisión bibliográfica, la vacuna contra EEV de virus vivo modificado o atenuado TC83 es una vacuna inocua y eficaz que puede utilizarse sin ningún riesgo en cualquier condición (28, 30, 32, 34).

La vacuna TC83 se ha venido produciendo en México en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuaras dependientes de la Secretaría de Agricultura y Ganadería desde 1971 y se ha empleado con excelentes resultados por la Campaña Nacional Contra la EEV de la Dirección General de Sanidad Animal, resultados a tal grado eficientes, que ha sido posible controlar la enfermedad de tal manera que, desde septiembre de 1972 en que se presentó el último brote, no se ha presentado otro en territorio nacional.

Hasta la fecha en el INIP se han producido alrededor de 25 millones de dosis, con las cuales se han realizado las campañas de vacunación en el país y ha sido posible controlar la epizootia en México y colaborar en países de Centro y Sudamérica como son: Guatemala, Salvador, Nicaragua, Honduras, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador y Perú, exportando alrededor de un millón de dosis para la realización de sus respectivas campañas.

2. Manejo y aplicación de la vacuna

La vacuna y el diluyente deberán conservarse siempre en refrigeración a 4°C , protegidos de los rayos solares, procurando que

tanto el diluyente como la vacuna ya reconstituida mantengan un pH adecuado, lo cual existe si el color del producto y el de la etiqueta es igual o muy parecido.

a) *Posología*: Inyectar 0.5 ml por vía subcutánea, usando una aguja diferente para cada animal.

Uso: Para inmunización de la Encefalitis Equina Venezolana en caballos, burros y mulas.

Presentación: Frascos ampula conteniendo vacuna liofilizada y frasco ampula de diluyente de 5 ml para preparar 10 dosis.

Precauciones: Es importante recordar que la vacuna contiene virus vivo y que la efectividad de la vacunación depende de la supervivencia del virus. Se deben tomar las precauciones siguientes:

1. La vacuna debe ser mantenida en la oscuridad a una temperatura inferior a 4°C; es importante que la vacuna esté refrigerada constantemente.

2. No utilizar nunca la vacuna reconstituida en su diluyente una hora después de su reconstitución.

3. Las agujas y las jeringas deben ser esterilizadas por ebullición o autoclave pero nunca con alcohol, formalina u otros productos químicos parecidos. Deberá utilizarse una aguja diferente para animal.

4. Ya que son necesarias 3 o 4 semanas para que la inmunidad sea completa, es importante mantener a los animales vacunados al abrigo de la infección y en reposo absoluto por las mismas 3 o 4 semanas, pudiéndose observar reacciones febriles de 3 a 5 días después de la vacunación.

5. Se recomienda que en las regiones donde los brotes de la enfermedad sean frecuentes se practique la revacunación anual para mantener un alto nivel de inmunidad.

6. Se reconoce que ninguna vacuna produce 100% de inmunidad y que a causa de exposiciones prolongadas y peligrosas, pueden ocurrir accidentes. Esto no quiere decir necesariamente que la vacuna ha fracasado, sino más bien que el contacto en el terreno con una cepa virulenta puede haber sucedido demasiado pronto después de la vacunación, o que el animal puede haber estado infectado. Por otra parte, se sabe que ciertos animales no pueden ser vacunados con éxito.

7. En caso de reacción anafiláctica, inyectar inmediatamente 1 ml por cada 80-100 kg de peso, de solución de clorhidrato de epinefrina al 1: 1000 por vía endovenosa.

REFERENCIAS

1. Center for Disease Control. Neurotropic viral diseases, surveillance Encephalitis. *Annual Encephalitis Summary*, 1969. 30-32. Venezuelan Equine Encephalomyelitis (VEE) in central America. October 15, 1970.
2. Dirección General de Sanidad Animal. *Informe del brote epizootico de Encefalitis Equina Venezolana*. Secretaría de Agricultura y Ganadería, 1970.
3. Correa, G. P. Encefalitis Equina de Venezuela. *Boletín del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*, 1972.
4. Siger, J., Parra, V. D., Pulgar, G. E., Castañeda, J. *Conferencia Internacional sobre vacunas contra EEV y otros virus de Encefalitis Equina*. Macaray, Venezuela, 11-17 de agosto de 1974.
5. Kubes, V. *La peste local de las bestias, sus manifestaciones, tratamiento y prevención*. Publicación del Ministerio de Agricultura y Cría. Caracas, Venezuela, 1936.
6. Kubes, V. y Ríos F. *Datos Preliminares sobre el agente etiológico de la encefalitis infecciosa de los equinos en Venezuela*. Publicación de la Dirección de Ganadería. Ministerio de Agricultura y Cría. Caracas, Venezuela, 1939.
7. Kubes, V. y Ríos, F. Preliminary data en the etiology agent of infections Encephalomyelitis of equine in Venezuela. *Science*. 90: 20, 1939.
8. Kubes, V. y Diamante, A. Estudios de inmunidad cruzada entre el virus de la Encefalomielitis Equina Venezolana y los virus Encefalomielitis Este y Oeste y el Argentino. *Bol. Inst. Inv. Vet.* 1. 2: 49-72, 1942.
9. Shahn, M. S. and Giltner, L. T. Equine Encephalomyelitis Studies. Cross Immunity test between Eastern and Western types of virus. *Jour. Vet. Med. Ass. Amer.* 39, 6: 764-772, 1935.
10. Mitchell, C. A., Walker, R. V. L., and Plummer, J. C. Studies in Equine Encephalomyelitis Chick-embryo vaccine as a protective agent, *Can. Jour. of Comparative Medicine.* 2. 8: 211-222, 1938.
11. Gilgard, R. T. Clinical Study of Venezuelan virus Equine Encephalomyelitis in Trinidad, R.W.T. *Jour. Amer. Vet. Med. Ass.*, 54. 818: 266277, 1945.
12. Randall, R., Milis, J. W., and Engel, L. L. The preparation and properties of a purified equine encephalomyelitis vaccines. *Jour. Immunol.* 55: 41-52, 1947.
13. Smith, D. G., Katz, H. H., and Wagner, J. C. Venezuelan Equine Encephalomyelitis. Preparation and evaluation partiall y purified vaccine. *Bact. Proc.*, 59, 1954.
14. Randall, R., Maurer, F. D., Smadel. J. E. Immunization of laboratory workers with purified Venezuela n Equine Encephalomyelitis vaccine. *Jour. Immunol.* 63: 313-318, 1949.
15. Sutton, L. S., and Brooke, C. C.; Venezuelan Equine Encephalomyelitis due to vaccination. *Jour. Amer. Med. Ass.* 155: 1473-1476, 1954.
16. Smith, D. G., Mamay, H. K., Marshall, R. G., and Wagner, J. C. Venezuelan Equine Encephalomyelitis. Laboratory aspects of fourteen human cases following vaccination and attempts to isolate the virol from the vaccine. *Amer. Jour. Hyg.* 63: 150-164, 1956.

17. Polley, J. R. The use of gamma radiations for the preparation of virus vaccine. *Can. Jour. Microbiol.* 8: 455-459, 1962.
18. Rertman, M., Tibble, J. R., and Green, L. Gamma Irradiated Venezuelan Equine Encephalitis vaccine. *Applied Microbiology*, 19, 5: 763767, 1970.
19. Gruber, J. Purification, concentration and inactivation of Venezuelan Equine Encephalitis virus. *Applied Microbiology*, 20, 3: 427-432, 1970.
20. Reitman, M., and Tonik, E. J. Immunity to aerosol challenge in guinea pigs immunized with Gamma-irradiated Venezuelan Equine Encephalitis vaccines. *Applied Microbiology*. 21, 4: 688-692, 1971.
21. Gruber, J. Immunogenicity of purified Venezuelan Equine Encephalitis virus inactivated by ionizing radiation. *Infection and immunity*. 3. 4: 574-579, 1971.
22. Musgay, M., Bergold, G. H., Weiland, E., and Vebershar, S. Preparation and evaluation of inactivated Venezuelan Equine Encephalitis vaccines. *Z. B. L. Veto Med.*, 19: 511-517, 1972.
23. Cole, F. E., May, S. W., and Robinson, D. M. Formalin Inactivated Venezuela n Equine Encephalomyelitis (Trinidad Strain) produced in rolling-bottles of chick embryo cells. *Appl. Microbiol.* 25, 2: 262-266, 1973.
24. Cole, F. E., May, S. W., Eddy, G. A. Inactivated Venezuelan Equine Encephalomyelitis vaccine prepared from attenuated (TC-83 Strain) virus. *Appl. Microbiol.* 27, 1: 150-153, 1974.
25. Cole, E. E., Mc. Kinney, R. W. Use of Hamster for Potency assay of Eastern an Western Equine Encephalitis vaccines. *Appl. Microbiol.*, 17, 6: 927-928, 1969.
26. Robinson, D. M., Berm, S., Lowenthal, J. P. Mouse potency assay for Western Equine Encephalomyelitis vaccines. *Appl. Microbio/.* 23, 1: 104107, 1972.
27. Conferencia Internacional sobre vacuna contra la Encefalitis Equina Venezolana y otros virus de la Encefalitis Equina. Patrocinado por Ministerios de Sanidad Animal y Asistencia Social, Agricultura y Cría y Organización Panamericana de la Salud. Maracay, Venezuela, 11-17 de agosto de 1974.
28. Mc. Kinney, R. W., Berge, T. O., Sawger, W. D., Tiggert, W. D., and Crozier, D. Use of a attenuated strain of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus for immunization in man. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 12: 597-603, 1963.
29. Berge, T. O., Banks, I. S., and Tiggert, W. D. Attenuation of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus by and in vitro cultivation en guinea pig heart cells. *Am. J. Hyg.* 73: 209-218, 1961.
30. Mc. Connell, S. Desarrollo y control de las vacunas a virus vivo modificado para el control de la Encefalitis Equina Venezolana. Mesa Redonda internacional sobre encefalitis equina tipo Venezuela. S. A. G., O. S. P., 12-14 de mayo de 1971.
31. Physical space and technical procedures for producing Venezuelan Equine Encephalitis vaccine live, attenuated. The National Drug Company. Division of Richardson-Merrell Inc. August, 1967.

32. Alevizatos, A. C., Mc. Kinney, R. W., and Feigin, R. D. Live attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus vaccine I. Clinical response of man to immunization. *Am. J. Trop. and Med. Hyg.* 16: 762-768, 1967.
33. Feigin, R. D., Jolger, R. F., Mc. Kinney, R. W., and Alevizatos, A. C. Live attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus vaccine II. Whole-Blood Amino-acid and fluorescent-antibody studies following immunization. *Am. J. of Trop. Med. and Hyg.* 16, 6: 769-77, 1967.
34. Spertzel, R. O., and Kahn, D. 9. Safety and efficacy of an attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis vaccine for use in equidae. *J.A.V.M.A.*, 1959, 731-739, 1971.
35. Walton, T. E., Alvarez, O., Buckwalter, R. M., and Johnson, K. M. Experimental infection of horses with an attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis vaccine (Strain TC-83). *Infect. Immun.* 5, 750-756, 1972.
36. Gochenur, W. S., Berge, T. O., Gelises, C. A. and Tiggert, W. D.; Immunization of burros with living Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus. *Am. jour. Hyg.* 75: 351-362, 1962.
37. Walton, T. E., and Johnson, K. M. Persistence of neutralizing antibody in equidae vaccinated with Venezuelan Equine Encephalomyelitis Vaccine Strain TC-83. *J.A.V.M.A.*, 161,8: 916-918, 1972.
38. Jochmin, M. M., Barber, T. L., Luedke, A. J. Venezuelan Equine Encephalomyelitis: Antibody Response in vaccinated horses and resistance to infection with virulent virus. *J.A.V.M.A.*, 162,4: 280-283, 1973.
39. Henderson, B. E., Chappel, W. A., Johnston, J. G. Et. al. Experimental infection of horses with three strain of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus. I Clinical and Virological Studies. *Amer. J. Epidem.*, 93: 194-205, 1971.
40. Sudia, W. D., Newhouse, V. F., and Henderson, B. E. Experimental infection of horses with tree strains of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus. II. Experimental vector studies. *Am. J. Epidem.*, 93, 3: 206-211, 1971.
41. Mercado, S. S., Batalla, C. D. Estudios de reversión a la patogenicidad de la cepa vacunal de Encefalitis Equina Venezolana en caballos. IX Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarías. 1820 de enero de 1972. *Téc Pec.* 19: 69, 1971.
42. Luedke, A. J. Barber, T. L., Foster, N. M., Batalla, D., and Mercado, S. Effect of back passage of Venezuelan Equine Encephalomyelitis TC-83 vaccine virus on clinical virological and immune responses in horses. *JA.V.M.A.*, 7: 824-831, 1972.
43. Monlux, W. S., Luedke, A. J., and Brown, J. Central nervous System. Response of horses to Venezuelan Equine Encephalomyelitis vaccines (TC-83). *J.A.V.M.A.*, 161,3: 265-269, 1972.
44. Monlux, W. S., Luedke, A. J., Mercado, S., Rosales, C., and Ríos, R. Effect of back passage of Venezuelan Equine Encephalomyelitis vaccine (TC-83) on the central nervous system of horses *J.A.V.M.A.*, 161, 7: 832-833, 1972.
45. Taylor, W. M., and Buff, E. Transmissibility of an attenuated Vene-

- zuelan Equine Encephalomyelitis Vaccine virus. *J.A.V.M.A.*, 161, 2: 159-163.
46. Batalla, C. D., Mancisidor, N., Díaz, G. A. y Mercado, S. Vacuna de virus vivo atenuado para la prevención de la Encefalitis Equina Venezolana en equinos *Téc. Peco* 19: 68, 1971.
 47. Batalla, C. D. y Mercado, S. S. Pruebas de inocuidad y antigenicidad en condiciones de campo de una vacuna de virus atenuado, contra la Encefalitis Equina Venezolana. *Téc. Pec.* 19: 69, 1971.
 48. Batalla, C. D., Landeros, A. y Mancisidor, N. Viabilidad de la vacuna contra la Encefalitis Equina Venezolana (TC-8S) utilizando diferentes diluyentes. *Téc. Pec.* 27: 46-50, 1974.
 49. Landeros, A. y Batalla, D. Supervivencia del virus de la Encefalitis Equina Venezolana en lotes de vacuna, mantenidas en refrigeración. X Reunión Anual del INIP, 11-16 febrero 1974, Méx., D. F., 1974. 50. Batalla, D. C. Modificación en la fórmula del estabilizador de la vacuna contra Encefalitis Equina Venezolana. *Téc. Pec.* 28: 34-37, 1975.