

MODIFICACIÓN EN LA FÓRMULA DEL ESTABILIZADOR DE LA VACUNA CONTRA ENCEFALITIS EQUINA DE VENEZUELA (CEPA TC - 83)

M.V.Z. DIÓDORO BATALLA CAMPERO¹

Resumen

Debido al gran número de problemas en el uso, manejo y conservación de la vacuna contra la encefalitis equina de Venezuela (EEV), en condiciones de campo, fue necesario hacer varios ensayos con lotes experimentales.

Se titularon cinco lotes de vacuna, elaborada con dos estabilizadores almacenados a 4 y 37°C, y reconstituidos a 0-1-2-5-10 y 15 días. La vacuna preparada con el estabilizador recomendado por la National Drug Company, mantenida a 4° C perdió 0.3 log. en 10 días y 1.5 log. en 15 días; mantenida a 37° C perdió 1 log. en un día, 2.3 log. en dos días y a los cinco días ya no se pudo detectar virus. La vacuna preparada con el nuevo estabilizador ensayado, mantenida a 4°C conservó el mismo título de virus después de 15 días, y mantenida a 37°C hasta cinco días, perdió 0.5 log. a 10 días y 1.2 después de 15 días.

Los resultados obtenidos indican la conveniencia de utilizar el nuevo estabilizador ensayado en la elaboración de la vacuna contra la EEV.

Introducción

Desde que fue desarrollada la vacuna contra EEV de virus vivo modificado (TC-83), se han hecho un gran número de estudios tanto de laboratorio como de campo, para demostrar las bondades en el uso y aplicación de la misma. En éstos se encontró que era un producto eficaz para la vacunación de humanos (Mc Kinney *et al.*, 1963) y caballos (Spertzel y Kahn, 1971) demostrándose anticuerpos hasta 20 meses después de la inmunización (Walton *et al.*, 1972), asimismo Mercado y Batalla (1971), y Monlux *et al.* (1972), demostraron que la vacuna no producía signos o lesiones macroscópicas o microscópicas en caballos susceptibles, aun después de cinco meses.

Otros estudios más recientes, como los de Walton y Johnson (1972), demuestran que es posible detectar anticuerpos neutralizantes en caballos vacunados después de 20 y 30 meses. Jochim *et al.* (1973), 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 su uso, y que resisten el desafío contra cepas virulentas.

La vacuna contra la EEV de virus vivo modificado o atenuado TC-83 es un producto inocuo y eficaz, que puede utilizarse sin ningún riesgo en cualquier condición; sin embargo, al ser empleada en el campo se presentaron un gran número de problemas en el uso, manejo y conservación de la misma. Por un lado, con el diluyente, el cual fue cambiado por otro que no representara problemas en su elaboración y manejo (Batalla, Landeros y Mancisidor, 1973); por otro lado, con el producto liofilizado en sí, ya que según las recomendaciones y el protocolo de producción obtenido de la National Drug Company, proporcionado por el U.S. Army Medical Research and Development Command de Fort Detrick, Maryland, 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, ya que si bien se cuenta con congeladores en los centros de distribución de la vacuna, como son los laboratorios regionales de la Red, Agencias de Agricultura y Ganadería, Uniones y Asociaciones Ganaderas, no es posible obtener hielo seco para distribuir la vacuna de ahí a los centros de vacunación; además, el CO₂ puede penetrar a las ampulas e inactivar el virus.

La vacuna se debía mantener a - 20°C, debido probablemente a que como era una vacuna desarrollada para uso humano, en su estabilizador no contiene proteínas para preser-

¹ Gerente de Producción. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, SAG. José María Velasco N° 75, Tercera Sección de Chapultepec, México 10, D.F.

var el virus. Si se desea que el virus permanezca vivo a 4°C, se deben agregar éstas.

Material y métodos

Se utilizaron cinco lotes de vacuna contra EEV TC-83; cada uno de estos lotes fue preparado por duplicado, utilizando dos estabilizadores, preparados de la siguiente manera:

- E 1) Recomendado por la National Drug Company 0.5% de seroalbúmina humana.
- E 2) Recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para la vacuna antirrábica, que contiene fosfato ácido de potasio, peptona, lactosa y 0.5% de albúmina bovina fracción V.

Una vez liofilizados los lotes de vacuna, se tomaron al azar 12 frascos de cada lote, los cuales fueron conservados en grupos de seis cada uno, a las temperaturas de 4 y 37°C. que representan aproximadamente las temperaturas de refrigeración y la de clima cálido de México.

De cada grupo se reconstituyeron las vacunas a los: 0-1-2-5-10 y 15 días de conservación a las temperaturas indicadas y se inocularon carnadas de ratones de dos a tres días de edad, por vía intracerebral con 0.02 ml de diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . Los ratones inoculados se observaron durante 14 días, anotándose la mortalidad con objeto de calcular la DL50% p^or el método de Reed and Muench.

Resultados

Los resultados obtenidos se expresan en los Cuadros 1 y 2 y en la Gráfica 1.

Los títulos obtenidos se expresan convencionalmente como logaritmos positivos.

En los frascos mantenidos en refrigeración a 4°C (Cuadro 1 y Gráfica 1) se puede observar que la vacuna elaborada con el estabilizador 1 mantiene un título más o menos similar hasta 10 días, pero que después de 15 días pierde hasta 1.7 logaritmos, quedando apenas en el límite inferior para su aprobación (3.7); mientras que los elaborados con el estabilizador 2, mantienen un título aceptable con un amplio margen hasta de 15 días.

CUADRO 1

Titulación de las vacunas conservadas a 4°C preparadas con dos estabilizadores diferentes

Núm. de lote	D Í A S				
	0	1	5	10	15
1-E1 ¹	*5	5.1	5	4.8	3.6
1-E2 ²	5	5.2	5	5.1	5
2-E1	5.2	5	5.1	4.7	3.5
2-E2	5.1	5.2	5.1	5.2	5.1
3-E1	4.9	5	5	4.5	3.3
3-E2	5.1	5.1	5.1	5	5.1
4-E1	5	5.1	5	4.6	3.5
4-E2	5.2	5.2	5	5.1	5.2
5-E1	5.2	5	5	4.9	3.7
5-E2	5.1	5.2	5	5	5.1
Promedio E1	5	5	5	4.7	3.7
Promedio E2	5.1	5.2	5	5.1	5.1

¹ El-Estabilizador 1

² E2-Estabilizador 2

* Expresado en logaritmos

En los frascos mantenidos a 37°C (Cuadro 2 y Gráfica 1) se puede observar que la vacuna elaborada con el estabilizador 1, después de un día, pierde entre 0.7 y 1.2 log., al segundo día pierde entre 2 y 2.6 log. y ya no alcanza el título mínimo requerido; después de tres días ya no existe virus detectable. Por otro lado, la elaborada con el estabilizador 2, mantiene títulos similares hasta los cinco días, perdiendo entre 0 y 0.8 log. a los 10 días y entre 1 y 1.4 a los 15 días, pero con títulos todavía superiores al mínimo requerido (3.7).

Discusión y conclusiones

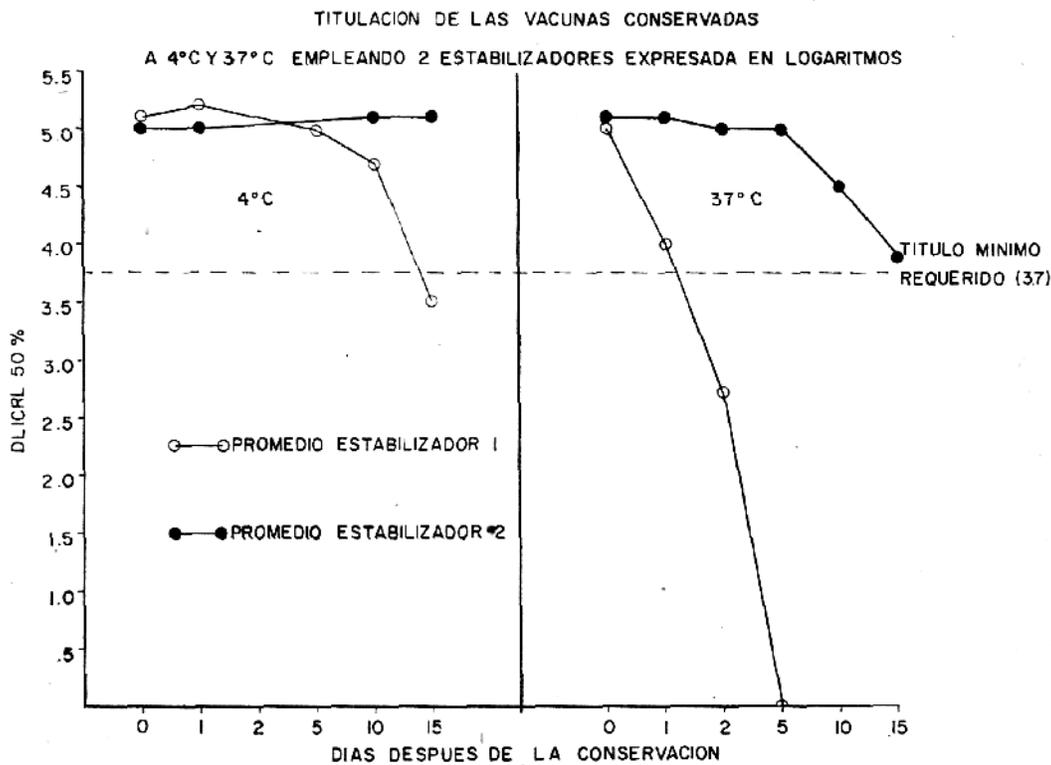
Los resultados indican que existe una diferencia significativa entre los estabilizadores empleados en el estudio. Estas investigaciones fueron motivo para que el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, como productor de la vacuna, propusiera al Consejo Técnico Intersecretarial, instituido para el control de la encefalitis equina, la aprobación para modificar la fórmula del estabilizador, por el número 2, que mantiene el virus viable por más tiempo.

CUADRO 2

Titulación de las vacunas conservadas a 37°C preparadas con dos estabilizadores diferentes

Número de Lote	D Í A S					
	0	1	2	5	10	15
1-E1 ¹	*5	4.1	2.7	<1	<1	—
1-E2 ²	5	5.1	5	5.1	5	4
2-E1	5.2	4	2.6	<1	<1	—
2-E2	5.1	5.1	4.9	5	4.5	4
3-E1	4.9	4.2	2.9	<1	<1	—
3-E2	5.1	5	5.1	5.1	4.3	3.9
4-E1	5	3.8	2.7	2	<1	<1
4-E2	5.2	5.2	5	5	4.5	3.9
5-E1	5.2	4	2.7	<1	<1	—
5-E2	5.1	5.1	5	4.9	4.5	3.9
Promedio E1	5	4	2.7	<1	<1	—
Promedio E2	5.1	5.1	5	5	4.5	3.9

1 El-Estabilizador 1
 2 E2-Estabilizador 2
 * Expresado en logaritmos



GRÁFICA I

Asimismo, la vacuna mantenida a 37°C con el estabilizador 2, pasa la prueba de envejecimiento acelerado (mantener el título de aprobación durante 7 días a 37°C). que la vacuna era incapaz de mantener anteriormente.

El proceso de envejecimiento acelerado se considera comparable a mantener la vacuna a 4°C, durante un año. Por lo anterior se considera que la vacuna estará en buenas condiciones de viabilidad durante dos años por lo menos. Este último punto está sujeto actualmente a investigación.

De igual manera, se destaca la importancia de mantener bajo estricta refrigeración la vacuna contra EEV desde el momento en que se produce hasta que es aplicada al animal.

Literatura citada

- BATALLA, C.D., A. LANCEROS y N. MANCISIDOR, 1973, Viabilidad de la vacuna contra encefalitis equina venezolana (TC-85), utilizando diferentes diluyentes, X Reunión Anual del *Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*, México, D.F., 16-28.
- JOCHIM, M.M., T.L. BARBER and A.J. LUEDKE, 1973, Venezuelan Equine Encephalomyelitis Antibody Response in Vaccinated Horses and Resistance to Infection with Virulent Virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 162, 4:280-283.
- Mc KINNEY, R.W., T.O. BERGE, W.D. SAWGER, W.D. TIGERTT and D. CROIZER, 1963, Use of an Attenuated Strain of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus for Immunization in Man, *Am. J. Trop. and Hyg.*, 12:597-603.
- MERCADO, S.S. y D. BATALLA, 1971, Estudios de reversión a la patogenicidad de la cepa vacunal de Encefalitis Equina de Venezuela en caballos, IX Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. *Tec. Pec. Méx.*, 19:69.
- MONLUX, W.S., A.J. LUEDKE, S. MERCADO, C. ROSALES and R. RÍOS, 1972, Effect of Back Passage of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Vaccine (TC-83) on the Central Nervous System of Horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 161, 7:832-833.
- SPERTZEL, R.O. and D.E. KAHN, 1971, Safety and Efficacy of an Attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis Vaccine for Use in Equidae. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 731-738.
- WALTON, T.E., O. ALVAREZ, R.M. BUCKWALTER and K.M. JOHNSON, 1972, Experimental Infection of Horses with an Attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis Vaccine (Strain TC-83). *Infect. Immun.* 5:750-756.
- WALTON, T.E. and K.M. JOHNSON, 1972, Persistence of Neutralizing Antibody in Equidae Vaccinated with Venezuelan Equine Encephalomyelitis Vaccine Strain TC-83, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 161, 8:916-918.

Summary

Due to the many problems found in the handling of Venezuelan Equine Encephalomyelitis vaccine in field conditions, it was necessary to do studies with experimental lots using two stabilizers. The vaccine prepared with stabilizer N° 1 maintained at 4°C, lost 1.5 log. in 15 days and maintained at 37°C, lost 2.3 logs. in 2 days and the virus was not detected after 5 days. The vaccine prepared with the stabilizer N° 2 maintained at 4°C, had the same tittle 15 days after, and maintained at 37°C, lost 1.2 logs. in 15 days.

The results indicated the convenience of using the stabilizer N° 2.