

## VIABILIDAD DE LA VACUNA CONTRA LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA (TC-85) UTILIZANDO DIFERENTES DILUYENTES

DIÓDORO BATALLA C.<sup>1</sup>  
MA. AZUCENA LANDEROS<sup>2</sup>  
NADIA MANCISIDOR<sup>2</sup>

### Resumen

Para reconstituir la vacuna contra la Encefalitis Equina de Venezuela (EEV), según el protocolo obtenido del Gobierno de los Estados Unidos, se recomienda el empleo de Solución Balanceada de Hank.

Dadas las dificultades que surgieron en la elaboración y manejo del diluyente, por su alto contenido en proteínas. Se probó la viabilidad del virus de la vacuna empleando otros diluyentes para reconstituirla. Los principales problemas de la Solución Balanceada de Hank son la dificultad que existe para su envase, ya que debe reunir las condiciones de esterilidad propias de estas sustancias, y que con un almacenamiento no muy prolongado se presentan contaminaciones por hongos, bacterias y cambios en el pH del mismo.

Los diluyentes usados en el presente trabajo fueron: Solución Balanceada de Hank. Solución Fosfatada Bufferada o Amortiguadora, Solución Salina Bufferada, Agua Bufferada,

Se calculó la viabilidad mediante la titulación en ratón lactante, de la vacuna reconstituida y mantenida en refrigeración a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 14 días.

Se encontró que la solución salina bufferada mantiene viable el virus después de reconstituida por un tiempo mayor que cualquiera de otros diluyentes, incluyendo el recomendado por el Gobierno de los Estados Unidos. Esto, además de resolver los problemas de contaminación y cambios de pH. abatió considerablemente el costo del diluyente.

La medida más efectiva con que se cuenta para el control de la EEV, es la vacunación de los animales susceptibles (Henderson *et al.*, 1971; Sudia, Newhouse y Henderson, 1971; Jochim, Barber y Luedke, 1973). Para dicha vacunación se cuenta en México con una vacuna elaborada con virus vivo modificado (Berge, Banks y Tigertt, 1961 y Feigin *et al.*, 1967), la cual se produce en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. El uso de esta vacuna para el control de la EEV, ha sido satisfactoria según señalan Mc. Kinney *et al.* (1963), Alevizatos, Mc. Kinney y Feigin (1967), Mc. Connell (1971).

En el protocolo de producción de la vacuna contra la EEV, establecido por el Gobierno de los Estados Unidos, se indica que para reconstituir la vacuna liofilizada se deberá emplear como diluyente, Solución Balanceada de Hank, adicionada de albúmina humana o de lacto albúmina al 0.5%.

En la elaboración y manejo de dicho diluyente surgieron un gran número de dificultades; debido a que se trata de un medio de

cultivo rico en proteínas siendo necesario que al preparar y envasar se haga dentro de las más estrictas condiciones de esterilidad; en ocasiones al esterilizarse se producen precipitados; encontrando también que en algunos irascos después de un almacenamiento no muy prolongado, se observa el crecimiento de hongos y bacterias contaminantes. Además es necesario mantenerlo en refrigeración constante, y aún así, en algunos casos se pueden observar alteraciones en el pH, con desviaciones tanto hacia la acidez como hacia la alcalinidad. Resultando un producto mucho más sensible que la misma vacuna, lo cual según señalan Schneider y Salem (1931), afecta directamente al virus.

Por estas razones se pensó en adicionar las proteínas estabilizadoras en el producto liofilizado. y suprimirlas del diluyente; empleando como tal solamente una solución amortiguadora con un indicador del pH.

Por lo expuesto se diseñó el presente trabajo, en el cual se comparó la viabilidad del virus vacunal, usando diferentes diluyentes. para posteriormente, si era posible emplear el que mantuviera viable el virus por más tiempo, comparándolo con los estudios hechos por Mc. Manus y Robinson (1972).

<sup>1</sup> Jefe del Depto. de Encefalitis Equina, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F.

<sup>2</sup> Departamento de Encefalitis Equina.

## Material y métodos

Se usaron 4 diferentes diluyentes que son (1) Solución Balanceada de Hank, (2) Solución Buffer de Fosfatos PBS, (3) Solución Salina Bufferada o amortiguadora y (4) Agua Bufferada o amortiguadora.

La viabilidad se calculó mediante la inoculación en ratón lactante de diluciones logarítmicas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) de cada uno de los diferentes lotes de vacuna reconstituidos con los 4 diluyentes.

La inoculación se hace siguiendo la técnica establecida por la Organización Mundial de la Salud, inyectando 0.02 ml por vía intracerebral en ratón lactante de 3 días de edad, empleando una carnada por dilución. El título del virus se calculó mediante la aplicación del método de Reed and Muench (1938).

Una vez inoculados los ratones con las muestras de vacuna recién reconstituida (0 hrs); los frascos se colocaron en refrigeración a 4°C, para posteriormente hacer nuevas titulaciones a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 14 días después de reconstituida.

Preparación de la Solución Balanceada de Hank. Disolver en el orden anotado en el Cuadro 1 las sales 1 a 6 en 12 litros de agua en un matraz de 18 litros, agregar el cloruro de calcio ya disuelto en 500 ml de agua, poner el rojo de fenol al 10% (de 3 a 4 ml), hasta que tome un color rojo cereza, ajustar el pH a 4, agregando de 1 a 2 ml de ácido

CUADRO 1

### Solución balanceada de Hank con 0.5% de lacto-albúmina

|   |               |
|---|---------------|
| 1. NaCl.  | 120.0 g       |
| 2. KCl.   | 6.0 g         |
| 3. Mg. SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O              | 3.0 g         |
| 4. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | .9 g          |
| 5. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | .2 g          |
| 6. Glucosa  | 15.0 g        |
| 7. Rojo de Fenol (10%)                                | 3.3 ml        |
| 8. CaCl <sub>2</sub>                                  | 2.1 g         |
| 9. NaHCO <sub>3</sub>                                 | 5.25g         |
| 10. Lacto Albúmina<br>Hydrolyzata                     | 82.5 g        |
| 11. Penicilina  | 2 millones UI |
| 12. Estreptomycin                                     | 2.0 g         |
| 13. Anfostat  | 100 mg        |
| 14. Agua Desmineralizada                              | 16.5 Lt       |

clorhídrico agitando perfectamente y esterilizar en el autoclave a 20 Lb durante 30 minutos.

Disolver el bicarbonato de Sodio en 1 It de agua y esterilizar en el autoclave durante 30 minutos. Disolver la lactoalbúmina en 3 It de agua, ajustar el pH de 7.4 a 7.6 y esterilizar por filtración con presión positiva en un filtro Seitz equipado con filtro EKS.

Al matraz de 18 lt conteniendo las sales 1 a 6 se le agrega el bicarbonato de Sodio hasta ajustar el pH de 7.4 a 7.6 agregar la lacto albúmina, 2 millones de penicilina, 2 gramos de estreptomycin y 100 mg de anfostat. Envasar en frascos previamente esterilizados por calor seco a 300°C durante 2 horas.

Preparación del PBS. Preparar las soluciones A y B disolviendo en agua destilada las sales en el orden anotado en el Cuadro 2, esterilizar por separado la Solución A y Solución B, a 15 Lb durante 15 minutos, dejar enfriar, mezclarlos y envasar en frascos previamente esterilizados por calor seco a 300°C durante 2 hrs.

CUADRO 2

### P.B.S. o solución Buffer de fosfato de sodio, cloruro de potasio, de sodio y de magnesio

| Solución A.  |        |
|--|--------|
| 1. NaCl  | 120 g  |
| 2. KCl   | 3 g    |
| 3. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O | 43.5 g |
| 4. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 3 g    |
| 5. Agua Destilada                                      | 12 Lt  |
| Solución B.  |        |
| 1. CaCl <sub>2</sub>                                   | 1.5 g  |
| 2. Mg. Cl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O             | 1.5 g  |
| 3. Agua Bidestilada                                    | 3 Lt   |

Preparación de la Solución Salina Bufferada y del Agua Bufferada. Se disuelven las sales, indicadas en los Cuadros 3 y 4 res-

CUADRO 3

### Solución salina bufferada 0.01 M. PH 7.4-7.6

|  |         |
|--|---------|
| 1. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O | 35.8 g  |
| 2. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O   | 5.52 g  |
| 3. NaCl  | 119.0 g |
| 4. Rojo de Fenol 10%                                   | 2 ml    |
| 5. Agua Destilada                                      | 14 Lt   |

CUADRO 4

**Agua bufferada 0.01 M. PH 7.4-7.6**

|    |   |        |
|----|---|--------|
| 1. | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O | 35.8 g |
| 2. | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> B <sub>2</sub> O   | 5.52 g |
| 3. | Rojo de Fenol 10%                                   | 2 ml   |
| 4. | Agua Destilada                                      | 14 Lt  |

pectivamente, en 14 lt de agua, y se envasa en frascos previamente lavados con agua bi-distilada para posteriormente esterilizarlos en autoclave a 20 libras durante 30 minutos.

**Resultados**

Los resultados obtenidos en las titulaciones efectuadas a diferentes intervalos después de reconstituida la vacuna, empleando los 4 diferentes diluyentes, se pueden observar en el Cuadro 5 y Gráfica 1, donde se encontró que a cero horas existe una diferencia de un loga-

ritmo entre la solución salina bufferada y el PBS y de medio logaritmo entre éste y el agua bufferada y Hank's respectivamente.

A las 48 horas después de reconstituidos los frascos de vacuna con los distintos diluyentes y mantenidos en refrigeración a 4°C, se encontró también superior en título de virus a la solución salina bufferada, en relación con los otros diluyentes empleados, comportándose de manera similar hasta una semana después.

Después de dos semanas, se encontró que ya no había virus detectable en los frascos de vacuna reconstituidos con PBS y agua bufferada, y en los reconstituidos con Hank's el título de virus detectable ya no es aceptable, según lo señalan los requisitos estándar para la vacuna contra la EEV (1973). Mientras que en los reconstituidos con solución salina bufferada existe un título del virus aceptable.

Al comparar el Hank con la solución salina bufferada, se encontró que no existen diferencias significativas, en los títulos detectados a diferentes lotes de vacuna y que el virus se

CUADRO 5

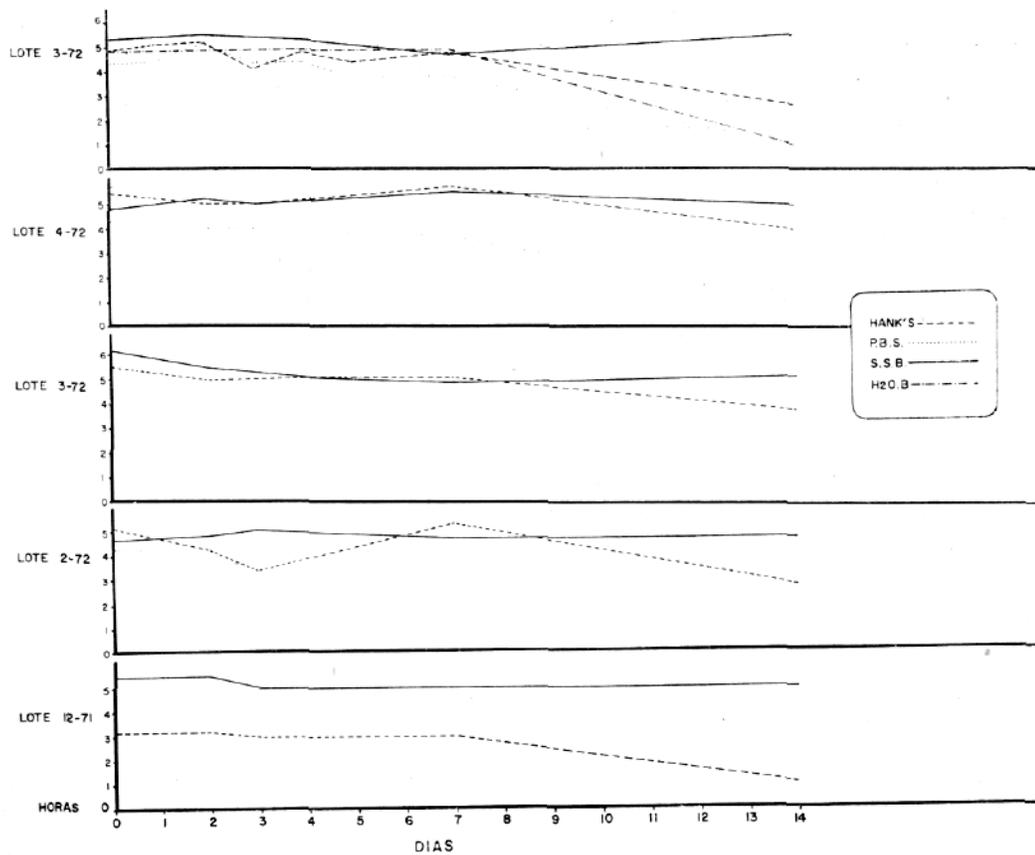
**Viabilidad de la vacuna contra la encefalitis equina venezolana empleando diferentes diluyentes**

|                      | 0 Hrs. | 1 día | 2 días | 3 días | 4 días | 5 días | 7 días | 14 días |
|----------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| Lote 3-72            |        |       |        |        |        |        |        |         |
| Hank                 | *4.8   | 5.1   | 5.2    | 4.1    | 4.8    | 4.4    | 4.7    | 2.7     |
| P. B. S.             | 4.3    | 4.4   | 5.1    | 4.4    | 4.4    | 3.8    | 3.8    | 1       |
| S. S. B.             | 5.3    | —     | 5.5    | —      | 5.3    | —      | 4.7    | 5.5     |
| H <sub>2</sub> O. B. | 4.8    | —     | 4.8    | —      | 4.9    | —      | 4.9    | 1       |
| Lote 4-72            |        |       |        |        |        |        |        |         |
| Hank                 | 5.4    | —     | 5.0    | 5.0    | —      | —      | 5.7    | 4.0     |
| P. B. S.             | 4.3    | —     | 4.0    | 4.0    | —      | —      | 3.7    | 1       |
| S. S. B.             | 4.8    | —     | 5.2    | 5.0    | —      | —      | 5.5    | 5.0     |
| Lote 3-72            |        |       |        |        |        |        |        |         |
| Hank                 | 5.5    | —     | 5.0    | —      | 5.1    | —      | 5.1    | 3.8     |
| S. S. B.             | 6.2    | —     | 5.5    | —      | 5.1    | —      | 4.9    | 5.2     |
| Lote 2-72            |        |       |        |        |        |        |        |         |
| Hank                 | 5.1    | —     | 4.2    | 3.3    | —      | —      | 5.2    | 2.7     |
| P. B. S.             | 4.2    | —     | —      | —      | —      | —      | —      | —       |
| S. S. B.             | 4.6    | —     | 4.8    | 5.0    | —      | —      | 4.6    | 4.6     |
| Lote 12-71           |        |       |        |        |        |        |        |         |
| Hank                 | 3.2    | —     | 3.2    | 3.0    | —      | —      | 3.0    | 1       |
| S. S. B.             | 5.5    | —     | 5.5    | 5.0    | —      | —      | 5.0    | 5.0     |

\* Expresado en logaritmos.

— No se titularon.

VIABILIDAD DE LA VACUNA CONTRA LA ENCEFALITIS EQUINA DE VENEZUELA  
EMPLEANDO DIFERENTES DILUYENTES.



mantiene viable, sin perder su potencia durante una semana después de reconstituida y mantenido a 4°C, pero que a 14 días los títulos encontrados en los frascos de vacuna reconstituidos con Hank se encuentran notablemente inferiores en relación con los detectados en los diluidos en solución salina bufferada.

**Discusión y conclusiones**

1. El P.B.S., mantiene el virus viable por muy poco tiempo, además requiere de cuidados muy especiales para su elaboración y almacenamiento, lo que acarrearía problemas similares a los encontrados con el uso del Hank's.

2. El agua bufferada aunque es de sencilla elaboración y manejo, no mantiene viable el virus por bastante tiempo.

3. La Solución Balanceada de Hank, mantiene un título de virus aceptable después de 1 semana de reconstituidos, pero no es capaz de mantenerlo un período mayor, además se presentan graves problemas en la elaboración y manejo.

4. La solución salina bufferada sí mantiene un título de virus aceptable por un largo período después de reconstituidos, aún mayor que el emplearse Hank's encontrando ciertas diferencias significativas al comparar la viabilidad mantenida por los 2 diluyentes, después de 2 semanas de reconstituidos.

La Solución Salina Bufferada es un producto que primero se prepara, se envasa y por último se esteriliza, por lo que nunca se presentan problemas de contaminación. Como es una solución amortiguadora, no cambia fácilmente de pH, y como no contiene proteínas no requiere de refrigeración.

Por último, además de todas estas ventajas y de resolver los problemas en la preparación del diluyente, por tratarse de una solución que se prepara con pocas sales y que no contiene proteínas, se abatió considerablemente el precio del diluyente; encontrando que es un producto recomendable para reconstituir la vacuna contra la Encefalitis Equina de Venezuela que se produce en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.

### Literatura citada

- ALEVIZATOS, A.C., RAV. Mc. KINNEY and R.D. FEIGIN, 1967, Live attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus vaccine I clinical responses of man to immunization, *Am. J. Trop. and Med. Hyg.*, 16:762-768.
- BERGE, T.O., I.S. BANKS and W.D. TIGERTT, 1961, Attenuation of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus by an in vitro Cultivation in guinea pig heart cells, *Am. J. Hyg.*, 73:209-218.
- FEIGIN, R.D., R.F. JAEGER. R.W. Mc. KINNEY and A.C. ALEVIZATOS, 1967, Live, attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus vaccine II Whole blood amino-acid and fluorescent antibody studies following immunization, *Am. J. Trop. and Med. Hyg.*, 16, 6 769-777.
- HENDERSON, B.E., W.A. CHAPPELL, J.G. JOHNSTON and W.D. SUDIA, 1971, Experimental infection of horses with three strains of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus I clinical and virological studies, *Am. J. of Epidem.*, 93, 3. 194-205.
- JOCHIM, M.M., T.L. BARBER, and A.J. LUEDKE, 1973, Venezuelan Equine Encephalomyelitis: Antibody Responses in vaccination horses and Resistance to infection with virulent virus, *J. Am. Vet. Med. Assc.* 162, 4. 280-283.
- Mc. CONNELL, S., 1971, Desarrollo y Control de las vacunas a virus vivo modificado para el control de la Encefalitis Equina Venezolana (EEV). *Me-*
- sa Redonda Internacional Sobre Encefalitis Equina tipo Venezolana. S.A.G. O.S.P., 12-14 Mayo 1971.
- Mc. KINNEY, R.W., T.O. BERGE, W.D. SAWYER, W. D. TIGERTT and D. CROZIER, 1963, Use of an attenuated Strain of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus for immunization in man, *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 12:597-603.
- Mc. MANUS, A.T. and D.M. ROBINSON, 1972, Stability of live attenuated Venezuelan Equine Encephalitis vaccine, *Appl. Micr.*, 23, 3 654-655.
- REED. L.J. and H. MUENCH, 1938, A simple method of estimating fifty per cent and points, *Am. J. Hyg.*, 27:493-497.
- Requisitos standard para la vacuna contra la Encefalomyelitis Venezolana, 1973, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal, Servicios Veterinarios, *Federal Center Building*, Hyattsville Maryland, 20782.
- SCHNEIDER, J.E. and L. SALEM, 1931. Rabies virus as affected by certain diluents. Clinical and case reports, 642-644.
- SUDIA, W.D., V.F. NEWHOUSE and B.E. HENDERSON, 1971, Experimental infection of horses with three Strains of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus II Experimental Vector Studies, *Am. J. of Epidemiology*, 93, 3 206-211.

### Summary

The technique for production of Venezuelan Equine Encephalomyelitis vaccine, indicate the use of Hank's balance salts solution to reconstitute the freeze died product.

That diluent is a rich culture medium, easy to contaminate and very susceptible to pH variation.

The viability of the V.E.E. vaccine was tested with four different diluents. Those were: Hank's balanced salts solution, Phosphate buffer solution, Buffer in saline solution, and buffer in water.

It was determined that the buffer in saline solution maintains the viability of the V.E.E. vaccine better than the other diluents.