

## CAPÍTULO 2.5.5.

# ENCEFALOMIELITIS EQUINA (del Este o del Oeste)

---

### RESUMEN

Los virus de la encefalomiелitis equina del Este (EEE) y del Oeste (EEO) pertenecen al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*. Las infecciones alternativas de pájaros y mosquitos mantienen a estos virus en el medio natural. La enfermedad aparece de forma esporádica en los seres humanos y en los caballos desde la mitad del verano hasta finales del otoño. Los seres humanos y los caballos constituyen hospedadores tangenciales finales. En los caballos la enfermedad se caracteriza por la presencia de fiebre, anorexia y depresión intensa. En los casos graves, la enfermedad de los caballos evoluciona hacia la hiperexcitabilidad, ceguera, ataxia, depresión mental grave, postración, convulsiones y muerte. La infección por el virus de la encefalomiелitis equina del Este (EEE) en los caballos es a menudo fatal, mientras que el virus de la encefalomiелitis equina del Oeste (EEO) puede provocar una enfermedad subclínica o moderada con menos de un 30% de mortalidad. Se ha descrito que tanto la EEE como la EEO provocan la enfermedad en las aves de corral, las aves de caza y las ratites. Se ha informado de casos esporádicos de la EEE en vacas, ovejas, cerdos, ciervos y perros.

**Identificación del agente:** Se puede realizar un diagnóstico presuntivo de la EEE o la EEO cuando los caballos susceptibles presentan la somnolencia característica y otros signos de la enfermedad neurológica en las áreas en las que son activos los insectos hematófagos. No se presentan lesiones generales características. Las lesiones histopatológicas pueden proporcionar un diagnóstico presuntivo. Normalmente, el virus de la EEE puede aislarse a partir del encéfalo y, a veces, a partir de otros tejidos de los caballos muertos; sin embargo, el virus EEO raramente puede aislarse. Los virus de la EEE y la EEO pueden aislarse a partir de especímenes silvestres mediante inoculación en ratones recién nacidos, huevos de pollo embrionados, cultivos celulares, o pollos recién nacidos. El virus se identifica mediante las pruebas de fijación del complemento (FC), inmunofluorescencia o reducción de la neutralización en placa (PRN). El ARN vírico de la EEE o la EEO también puede detectarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

**Pruebas serológicas:** Los anticuerpos pueden identificarse mediante la PRN, la inhibición de la hemoaglutinación (IH), la FC o el enzimoimmunoanálisis de captura de IgM.

**Requisitos para las vacunas:** Las vacunas frente a la EEE o la EEO son seguras e inmunogénicas. Se producen en cultivos celulares y se inactivan con formalina.

### A. INTRODUCCIÓN

Los virus de la encefalomiелitis equina del Este (EEE) o del Oeste (EEO) son miembros del género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*. La ecología natural para el mantenimiento del virus ocurre por la vía de la infección alternativa de las aves y los mosquitos ornitofílicos. El virus de la EEE se ha aislado de serpientes, y estas podrían intervenir como hospedadores reservorio (Bingham *et al.*, 2012). Puede presentarse la enfermedad clínica en los humanos y en los caballos, los cuales son hospedadores finales para estos agentes. La EEE se ha diagnosticado en Quebec y Ontario en Canadá, en las regiones central y oriental de los Estados Unidos de América (EEUU), las Islas del Caribe, México, y América Central y del Sur. La enfermedad causada por el EEO se ha descrito en el oeste de EEUU y Canadá, México y América Central y del Sur (Morris, 1989; Reisen & Monath, 1989; Walton *et al.*, 1981). El virus J de las tierras altas, relacionado antigénicamente con el virus EEO, se ha aislado en el este de EEUU. Aunque generalmente se cree que el virus J de las tierras altas no provoca la

enfermedad en los mamíferos, ha sido aislado a partir del encéfalo de un caballo que murió de encefalitis en Florida (Karabatsos *et al.*, 1988).

Aún cuando la mortalidad es menor en el caso de la EEO, los signos de la EEE y la EEO pueden ser idénticos. La enfermedad causada por cualquiera de los dos virus también se denomina enfermedad del sueño. Después de un periodo de incubación de entre 5 y 14 días, los signos clínicos son fiebre, anorexia y depresión. Puede realizarse un diagnóstico presuntivo de la infección por los virus de la EEE o la EEO en los caballos no vacunados si se observa la somnolencia típica cuando el vector (mosquito) es abundante durante el verano en los climas templados, o durante la estación húmeda en los climas tropicales o subtropicales. Sin embargo, varias enfermedades, como el virus del Nilo occidental, y la encefalomiелitis equina venezolana (capítulos 2.1.24 y 2.5.12, respectivamente), producen signos clínicos parecidos, y el diagnóstico debe confirmarse mediante las pruebas que se describen a continuación. A menudo la infección por el virus de la EEO abarca una amplia zona geográfica, p. ej. los casos esporádicos en unas 1.000 millas cuadradas. Normalmente, las infecciones por el virus EEE se presentan en zonas geográficas limitadas. Se ha relacionado la aparición esporádica de una gran mortalidad en las aves de caza criadas en cautividad, principalmente en faisanes, chukars, pingüinos de acuario y codornices con la EEO, EEE, o el virus J de las Tierras Altas (Morris, 1989; Reisen & Monath, 1989; Tuttle *et al.*, 2005). La mayoría de las infecciones por encefalomiелitis en las aves domésticas son provocadas por el virus de la EEE y tienen lugar en los estados de la costa este de los EEUU. El virus es introducido por los mosquitos, aunque la transmisión en las bandadas tiene lugar principalmente a través de restos de plumas y mediante el canibalismo. Tanto el virus de la EEE como el de la EEO han provocado una enfermedad letal en las ratites. Se ha descrito una enteritis hemorrágica en emús infectados por los virus de la EEE y la EEO, y los porcentajes de morbilidad y mortalidad pueden ser superiores al 85%. Se ha encontrado que los virus J de las Tierras Altas y el de la EEE producen en los pavos depresión, somnolencia, una disminución en la producción de huevos y un aumento de la mortalidad (Guy, 1997). Se ha descrito que el virus de la EEE provoca la enfermedad en las vacas (McGee *et al.*, 1992; Pursell *et al.*, 1976), las ovejas (Bauer *et al.*, 2005), los cerdos (Elvinger *et al.*, 1996), los ciervos de cola blanca (Tate *et al.*, 2005), y los perros (Farrar *et al.*, 2005).

El virus de la EEE causa una enfermedad grave en los seres humanos con una tasa de mortalidad del 30–70% y una elevada frecuencia de aparición de secuelas permanentes en los supervivientes. Normalmente la EEO es una infección leve en los humanos adultos, aunque puede ser una enfermedad grave en los niños. La tasa de mortalidad se encuentra entre el 3 y el 14%. Se han descrito infecciones graves y muertes de trabajadores de laboratorio. Las manipulaciones que tengan lugar en el laboratorio deberán llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y bioprotección adecuado, que se determinará mediante un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). Se recomienda que se inmunice al personal frente a los virus EEE y EEO (United States Department of Health and Human Services, 1999). También deben tomarse precauciones para prevenir la infección en los humanos cuando se realicen exámenes post mórtem en los caballos sospechosos de haber sido infectados por los virus de la encefalomiелitis equina.

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos de los que se dispone para el diagnóstico de la encefalomiелitis equina del este y sus finalidades \*

Método	Finalidad				
	Determinar la ausencia de infección en la población	Determinar la ausencia de infección en animales determinados	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales determinados o poblaciones post-vacunación
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>					
RT-PCR	–	++	+++	–	–
Aislamiento en cultivo tisular	–	++	+++	–	–
<b>Detección de la respuesta inmunitaria</b>					
Inmunohistoquímica	–	++	+++	–	–

1 Se recomienda combinar varios métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica

Método	Finalidad				
	Determinar la ausencia de infección en la población	Determinar la ausencia de infección en animales determinados	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales determinados o poblaciones post-vacunación
ELISA de captura de IgM	–	+	++	–	–
Neutralización por reducción de placas	+++	+	++	+++	+++
Inhibición de la hemaglutinación (muestras pareadas)	+	++	++	++	++
Fijación del complemento (muestras pareadas)	–	+	++	–	–

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método adecuado; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para esta finalidad.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido estandarizadas y validadas formalmente, su perfil sistemático y el hecho de que se hayan utilizado mucho sin resultados dudosos, las hace aceptables.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa;

ELISA = enzimoimmunoanálisis.

\*Aunque los métodos de diagnóstico para la encefalitis equina del oeste son similares, no todas las modalidades de pruebas se han evaluado completamente en caballos con infección natural por el virus de la EEO.

## 1. Identificación del agente

El método definitivo para el diagnóstico de la EEE o la EEO consiste en el aislamiento de los virus. Normalmente el virus EEE puede aislarse a partir de los encéfalos de los caballos, a menos que hayan pasado más de 5 días entre la aparición de los signos clínicos y la muerte del animal. Frecuentemente el virus de la EEE puede aislarse a partir de tejido encefálico, incluso en presencia de un título de anticuerpo sérico elevado. El virus de la EEO raramente se aísla a partir de los tejidos de los caballos infectados. El encéfalo es el tejido preferido para el aislamiento del virus, aunque este ha sido aislado a partir de otros tejidos, como el hígado o el bazo. Se recomienda recoger un conjunto completo de estos tejidos por duplicado, uno para el aislamiento del virus y el otro en presencia de formalina para su examen histopatológico. Los especímenes destinados al aislamiento del virus deberían enviarse refrigerados, si se pueden recibir en el laboratorio en un plazo máximo de 48 horas tras la extracción; en otro caso, deben congelarse y enviarse con hielo seco. La recogida de un conjunto completo de tejidos permitirá utilizar técnicas diagnósticas de otras enfermedades. Para llevar a cabo el aislamiento del virus, se prepara una suspensión del tejido al 10% en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,8, que contenga seroalbúmina bovina (BSA) (fracción V; 0,75%), penicilina (100 unidades/ml), y estreptomycin (100 µg/ml). La suspensión se clarifica mediante centrifugación a 1.500 g durante 30 minutos.

Los virus de la EEE y la EEO pueden aislarse en varios tipos de cultivos celulares. Los que más se utilizan son los fibroblastos de embrión de pollo o pato, las líneas celulares continuas de riñón de mono verde africano (Vero), el riñón de conejo (RK-13), o el riñón de hámster recién nacido (BHK-21). El aislamiento se hace normalmente en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>. Se inoculan las células confluentes con 1,0 ml de suspensión de tejido. Tras un período de absorción de entre 1 y 2 horas, se añade medio de mantenimiento. Se incuban los cultivos durante 6–8 días, y se realiza un pase ciego. Los virus de la EEE y a la EEO producirán una alteración citopática en el cultivo celular. Se congelan los cultivos que estén infectados. El líquido de los cultivos descongelados se utiliza para la identificación del virus.

Al ratón recién nacido también se le considera como un sistema hospedador sensible. Se inoculan intracranealmente una o dos camadas de ratones de entre 1 y 4 días de edad con 0,02 ml de inóculo, empleando una aguja del calibre 26 (de 9,3 mm) acoplada a una jeringa de 1 ml. El punto de la inoculación es exactamente junto a la línea media de la porción central de uno de los hemisferios laterales. Los ratones se observan durante 10 días. Se descartan los ratones muertos durante las 24 horas siguientes a la inyección. Entre 2 y 10 días posteriores a la inyección, los ratones muertos se recogen diariamente y se congelan a –70°C. Para realizar la identificación del virus, los encéfalos de los ratones se concentran mediante aspiración, empleando una aguja de una pulgada del calibre 10 (2,5 cm) acoplada a una jeringa de 1ml. Solamente se realiza un segundo pase si el virus no puede identificarse a partir de los ratones que mueren después de la inoculación.

El embrión de pollo se considera menos sensible que los ratones recién nacidos cuando se emplea para el aislamiento primario de los virus de la EEE y la EEO. Pueden inocularse suspensiones de tejido en la yema de huevos de pollo embrionados de 6–8 días. En los embriones infectados con estos virus no existen signos diagnósticos o lesiones. Los embriones inoculados deben incubarse durante 7 días, aunque normalmente las muertes tienen lugar entre 2 y 4 días después de la inoculación. Generalmente sólo se realiza un pase, a menos que se observen embriones muertos, a partir de los cuales no se puede aislar el virus. Los pollos recién nacidos son susceptibles y se han empleado para el aislamiento del virus. Si se utiliza este método, debe tenerse la precaución de prevenir la exposición del personal del laboratorio a los aerosoles, ya que las aves infectadas pueden eliminar virus muy virulentos.

Los virus de la EEE o la EEO pueden identificarse en los encéfalos de ratones o pollos infectados, en el sobrenadante de medio de cultivo celular, o en líquido amniótico o alantoideo cuando se utiliza la prueba de FC. Se prepara una suspensión al 10% en tampón veronal (barbitona); los líquidos obtenidos de los huevos o de los cultivos celulares se utilizan sin diluir o diluidos 1/10 en tampón veronal. El líquido o suspensión se centrifuga a 9.000 **g** durante 30 minutos, y el sobrenadante se analiza frente a un suero hiperinmune o líquido ascítico de ratón preparado frente a los virus de la EEE y la EEO empleando un protocolo normalizado de FC (United States Department Of Health, Education and Welfare, 1974). Esta prueba requiere la incubación de la mezcla suero-antígeno con 7 unidades de complemento durante la noche a 4°C. El virus puede identificarse en los cultivos celulares mediante la inmunofluorescencia. El método utilizado con menor frecuencia para la identificación del virus consiste en las pruebas de neutralización, como se indica seguidamente.

Se han descrito métodos de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para detectar ácido nucleico del virus de la EEE, la EEO y la EEV en los mosquitos, y se han descrito en tejidos de los vertebrados, aunque solo unos pocos han sido ampliamente validados para muestras de mamíferos (Lambert *et al.*, 2003; Linssen *et al.*, 2000; Monroy *et al.*, 1996; Vodkin *et al.*, 1993). Se desarrolló un método de RT-PCR multiplex para realizar un diagnóstico diferenciado en casos sospechosos de EEE o encefalomiелitis arboviral del Nilo occidental en caballos (Johnson *et al.*, 2003). Ha mejorado la rapidez y la sensibilidad de la prueba en comparación con el aislamiento mediante cultivo celular y se ha utilizado de forma eficaz en EE.UU. durante estacionales recientes en las que proliferó la transmisión de los arbovirus. Recientemente se ha informado sobre un método combinado de RT-PCR y enzimoimmunoanálisis (ELISA: RT-PCR-ELISA) para identificar a los alfavirus que son patógenos para los humanos (Wang *et al.*, 2006).

Se ha desarrollado un enzimoimmunoanálisis (ELISA) de captura antigénica para la vigilancia del virus EEE en los mosquitos. Puede utilizarse en los países que no poseen instalaciones para el aislamiento del virus o la realización de la RT-PCR (Brown *et al.*, 2001). Los procedimientos inmunohistoquímicos son muy útiles para el diagnóstico de la EEE, puesto que se llevan a cabo con tejidos fijados (Pennick *et al.*, 2012). La proteína de envoltura del virus de la EEE es aquella a la cual va dirigida la prueba de la IHC. Se examinan zonas necróticas e inflamadas del encéfalo. En caballos infectados por el virus de la EEE, se observa tinción positiva de forma más destacada en neuronas y procesos dendríticos asociados.

## 2. Pruebas serológicas

La confirmación serológica de la infección por el virus de la EEE o la EEO implica un aumento o descenso de 4 o más veces en el título de anticuerpos de las muestras de pares de sueros recogidos con 10–14 días de diferencia. Cuando se manifiesta la enfermedad clínica, la mayoría de los caballos infectados por los virus de la EEE o la EEO presentan un título elevado de anticuerpos. En consecuencia, puede realizarse un diagnóstico presuntivo si un caballo no vacunado y con los signos clínicos adecuados presenta anticuerpos frente a los virus de la EEE y la EEO. La detección de IgM mediante un ELISA también puede proporcionar un diagnóstico presuntivo de la infección aguda (Sahu *et al.*, 1994). La prueba de neutralización por reducción de placas (PRN) o, preferiblemente, una combinación de las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (IH) y PRN es el procedimiento utilizado más frecuentemente para la detección de anticuerpos frente a los virus de la EEE y la EEO. En las pruebas de FC e IH puede haber reacción cruzada entre el anticuerpo frente a los virus de la EEE y la EEO. Los anticuerpos frente a los virus de la EEE y la EEO que se detectan mediante FC aparecen más tarde y no son duraderos; en consecuencia, es menos útil para el diagnóstico serológico de la enfermedad.

### 2.1. Prueba de Fijación del complemento

La prueba de la FC se utiliza frecuentemente para demostrar la presencia de anticuerpos, aunque los anticuerpos que se detectan mediante esta prueba pueden no persistir durante tanto tiempo como los que se detectan con las pruebas IH o PRN. Como antígeno se utiliza habitualmente un extracto de encéfalo de ratón obtenido en presencia de sacarosa/acetona. El antígeno positivo se inactiva mediante tratamiento con beta-propiolactona al 0,1%.

En ausencia de un suero internacional normalizado, el antígeno debe titularse frente a un suero positivo control preparado en la región. El antígeno normal, o antígeno control, consiste en encéfalo de ratón obtenido a partir de ratones no inoculados, y extraído y diluido de manera similar.

Los sueros se diluyen a 1/4 en solución salina tamponada con veronal que contenga gelatina (VBSG) al 1% y se inactivan sometiéndolos a 56°C durante 30 minutos. Las titulaciones de los sueros positivos pueden llevarse a cabo empleando diluciones medias adicionales. Los antígenos para la FC y el antígeno control (encéfalo de ratón sano) se diluyen en VBSG hasta conseguir la cantidad óptima para su fijación, la cual se determina mediante titulación frente a los sueros positivos; el complemento de cobaya se diluye en VBSG hasta contener 5 unidades hemolíticas de complemento 50% (CH<sub>50</sub>). Los sueros, el antígeno y el complemento se mezclan durante 18 horas a 4°C en placas de microtitulación con fondo redondo. Los eritrocitos de oveja (SRBC) se estandarizan hasta obtener una concentración del 2,8%. La hemolisina se titula para determinar la dilución óptima frente al lote de complemento utilizado. La hemolisina se emplea para sensibilizar los SRBC al 2,8%, y estos se añaden a todos los pocillos de la placa de microtitulación. La prueba se incuba durante 30 minutos a 37°C. Las placas se centrifugan (a 200 g), y los pocillos se puntúan en cuanto a la presencia de hemólisis. Se utilizan los siguientes controles: (a) suero y suero control con 5 CH<sub>50</sub> y 2,5 CH<sub>50</sub>, respectivamente; (b) antígeno para la FC y antígeno control, cada uno con 5 CH<sub>50</sub> y 2,5 CH<sub>50</sub> de complemento, respectivamente; (c) diluciones de complemento de 5 CH<sub>50</sub>, 2,5 CH<sub>50</sub>, y 1,25 CH<sub>50</sub>; y (d) pocillos con células control, con sólo SRBC, y VBGS como diluyente. Estos controles se ensayan para determinar la presencia de suero y antígeno anticomplementarios, la actividad del complemento utilizado en la prueba, y la integridad del sistema indicador de SRBC en ausencia de complemento, respectivamente.

Para evitar los efectos anticomplementarios, los sueros deben separarse de la sangre lo antes posible. En la prueba deben utilizarse sueros control positivos y negativos.

## 2.2. Inhibición de la hemoaglutinación

El antígeno que se emplea para realizar la prueba de IH es el mismo que el descrito anteriormente para la prueba FC. El antígeno se diluye de manera que la cantidad empleada en cada unidad de hemoaglutinación (HAU) es de 4 a 8 veces la que aglutina el 50% de los RBC en el sistema de la prueba. El título de hemoaglutinación y el pH óptimo para cada antígeno se determinan con RBC de oca diluidos en soluciones tamponadas a un pH que varía entre 5,8 y 6,6, con incrementos de 0,2 unidades.

Los sueros se diluyen 1/10 en tampón salino borato, pH 9,0, y se inactivan a 56°C durante 30 minutos. El tratamiento con kaolín se emplea para eliminar los inhibidores específicos del suero. Como alternativa, pueden separarse los inhibidores inespecíficos mediante el tratamiento del suero con acetona en dilución de 1/10 en PBS seguido de su reconstrucción en tampón borato salino. Los sueros deberían adsorberse antes de su uso mediante la incubación durante 20 minutos a 4°C con un volumen de 0,05 ml de RBC de oca lavados y concentrados.

Después de realizar la inactivación mediante calor, el tratamiento con kaolín y la absorción, se preparan diluciones dobles del suero tratado en tampón borato, pH 9,0, con ovoalbúmina al 0,4%. Se preparan diluciones dobles del suero (0,025 ml/pocillo) con tampón borato, pH 9,0, con ovoalbúmina al 0,4% en una placa de microtitulación de fondo redondo con 96 pocillos. Se añade el antígeno (0,025 ml/pocillo) al suero. Las placas se incuban a 4°C durante la noche. Los RBC derivan de machos de ganso blanco<sup>2</sup> y se lavan tres veces con dextrosa/gelatina/veronal (DGV), y se prepara una suspensión al 7% en DGV. La suspensión al 7% se diluye 1/24 en la solución de pH adecuada, y se añaden inmediatamente a las placas a razón de 0,05 ml por pocillo. Las placas se incuban durante 30 minutos a 37°C. En cada prueba se incorporan sueros control positivos y negativos. Una prueba sólo se considera válida si los sueros control dan los resultados esperados. Los títulos de 1/10 y 1/20 son sospechosos, y los títulos de 1/40 y superiores son positivos.

## 2.3. El enzoinmunoanálisis

La técnica ELISA se realiza recubriendo las placas de fondo plano con un anticuerpo anti IgM equina de captura (Sahu *et al.*, 1994). El anticuerpo se diluye siguiendo las recomendaciones del fabricante en tampón carbonato 0,5M, pH 9,6, y se añaden 50 µl a cada pocillo. Las placas se incuban a 37°C durante 1 hora y toda la noche a 4°C. Antes de su uso, las placas recubiertas se lavan tres veces con 200 µl/pocillo de PBS 0,01 M que contiene Tween 20 al 0,05%. Después del segundo lavado, se

2 Son preferibles los RBC de los gansos blancos adultos domésticos, aunque se pueden utilizar otros gansos machos. Si se utilizan células de hembras, pueden presentar mayor variabilidad en la prueba. Se ha descrito que los RBC de gallo provocan un descenso de la sensibilidad de la prueba.

añaden 200 µl/pocillo de PBS/Tween/leche desnatada en polvo al 5%, y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se lavan de nuevo tres veces con PBS/Tween. Los sueros control y problema se diluyen a 1/400 con PBS 0,01 M, pH 7,2, que contiene Tween 20 al 0,05%, y se añaden 50 µl en cada pocillo. Las placas se incuban a 37°C durante 90 minutos y después se lavan tres veces. A continuación, se añaden 50 µl de antígeno vírico a todos los pocillos. (La dilución del antígeno dependerá de la fuente y debería determinarse empíricamente). Las placas se incuban durante la noche a 4°C y se lavan tres veces. Después se añaden 50 µl de anticuerpo monoclonal (MAb) frente al virus de la encefalitis conjugado con peroxidasa de rábano<sup>3</sup>. Las placas se incuban durante 90 minutos a 37°C y después se lavan seis veces. Finalmente, se añaden 50 µl de sustrato ABTS (2,2-Azino-bis-[3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfónico]) recién preparado + peróxido de hidrógeno, y se incuban las placas a temperatura ambiente durante 15–40 minutos. La absorbancia del suero problema se mide a 405 nm. Una muestra problema se considera positiva si su absorbancia en los pocillos que contienen antígeno vírico es de al menos el doble de la absorbancia de la muestra analizada en paralelo en los pocillos que contienen el antígeno normal.

## 2.4. Neutralización por reducción de placas

La prueba PRN es muy específica y puede utilizarse para distinguir entre las infecciones por los virus de la EEE y la EEO. La PRN se realiza con fibroblastos de embrión de pato, o con cultivos celulares de células Vero o BHK-21 en frascos de 25 cm<sup>2</sup> o placas de seis pocillos. Los volúmenes listados son para los frascos, y los volúmenes se deben reducir a la mitad para las placas con seis pocillos. Los sueros se pueden analizar a una dilución final de 1/10 y 1/100. Los puntos finales pueden establecerse empleando la PRN o la IH. El suero que se utiliza en la prueba PRN se prueba frente a 100 unidades formadoras de placa víricas (UFP) (50 UFP para placas con seis pocillos). La mezcla virus/suero se incuba a 37°C durante 75 minutos antes de la inoculación sobre monocapas confluentes de cultivo celular en frascos de 25 cm<sup>2</sup>. El inóculo se adsorbe durante 1 hora, seguido de la adición de 6 ml de medio de cobertura. El medio de cobertura consiste en dos soluciones que se preparan separadamente. La solución I contiene Solución Básica de Sales de Earle 2x sin rojo fenol, 4% de suero bovino fetal, 100 µg/ml de gentamicina, 200 µg/ml de nistatina, una solución al 0,45% de bicarbonato de sodio, y rojo neutro al 0,002%. Cuando se usan fibroblastos de embrión de pato, la solución I también contiene un 6,6% de hidrolizado de lactoalbúmina y extracto de levadura. La solución II contiene un 2% de agar noble esterilizado y mantenido a 47°C. Se mezclan volúmenes iguales de las soluciones I y II se ajustan a 47°C justo antes de usarse. La prueba se incuba durante 48–72 horas, y los puntos finales se basan en una reducción del 90% en el número de placas comparado con los frascos con el virus control, los cuales deben producir unas 100 placas.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

### 1. Antecedentes

Las vacunas inactivadas frente a los virus de la EEE y la EEO se encuentran disponibles comercialmente. Las vacunas con virus atenuados de la EEE y la EEO no han resultado satisfactorias. Las vacunas autorizadas para su comercialización en los EEUU se preparan empleando las siguientes combinaciones: EEE y EEO; EEE, EEO y encefalomiелitis equina de Venezuela (EEV); y EEE y EEV. Además, se han combinado toxoide del tétano, virus inactivado de la gripe y virus inactivado del Nilo occidental con EEE y EEO, o EEE, EEO, y EEV. Las vacunas actuales se preparan a partir de virus propagados en cultivo celular, e inactivados con formalina (Maire *et al.*, 1970).

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices indicadas a continuación y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden complementarse con requisitos nacionales o regionales.

### 2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

#### 2.1. Características del inóculo

Véase el Capítulo 1.1.8 para conocer los requisitos generales para los Inóculos Primarios y los pases permitidos para la producción de vacuna. Los lotes de inóculo adecuados deben mantenerse a -70°C en estado liofilizado.

3 Disponible en: *Centers for Disease Control and Prevention, Biological Reference Reagents*, 1600 Clifton Road NE, Mail Stop C21, Atlanta, Georgia 30333, Estados Unidos de América.

### 2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Las cepas normalizadas de los virus de la EEE y la EEO que fueron aisladas hace unos 20 años han sido utilizadas para la producción de la vacuna y han resultado ser capaces de inducir una inmunidad protectora. En diferentes regiones se han identificado cepas del virus de la EEE que son distintas antigénicamente y en cuanto a su estructura molecular. Sin embargo, las cepas de América del Norte y el Caribe parecen similares (Weaver *et al.*, 1994). Las cepas del virus de la EEO aisladas en diferentes países han resultado ser semejantes, en base a pruebas con MAb y a los análisis de huella genética de oligonucleótidos de ARN (Reisen & Monath, 1989). Sería ventajoso utilizar una cepa bien caracterizada del país donde se va a emplear la vacuna. Los virus seleccionados deben ser inmunogénicos y replicarse en cultivo celular con títulos elevados.

### 2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

En el MSV debe comprobarse la pureza, la identidad y la ausencia de agentes extraños en el momento previo a su uso para la fabricación de vacuna. El MSV debe estar libre de bacterias, hongos y micoplasmas. El MSV se cultiva en una línea celular Vero y en un tipo celular equino embrionario y se confirma mediante la técnica de la inmunofluorescencia para poner de manifiesto la ausencia de herpesvirus equino, adenovirus equino, virus de la arteritis equina, virus de la diarrea vírica bovina, reovirus y virus de la rabia como agentes extraños. El MSV también debe estar libre de virus extraños, lo cual deberá comprobarse por la ausencia de efecto citopático (ECP) y por la prueba de la hemadsorción en cultivo celular con la línea celular Vero y un tipo celular equino embrionario.

### 2.1.3. Validación como cepa vacunal

En una prueba de inmunogenicidad, el MSV al máximo nivel de pases destinado a la producción de vacuna debe demostrar su eficacia (protección) en una prueba de potencia realizada con vacunación/análisis serológicos en cobayas.

### 2.1.4. Procedimiento de emergencia para la aceptación provisional de nuevos virus a utilizar como inóculo primario (MSV) en el caso de una epizootia (con agentes patógenos con muchos serotipos, por ejemplo, el virus de la lengua azul, el virus de la influenza aviar altamente patógena, el virus, la fiebre aftosa, etc.)

En situaciones de emergencia debidas a epizootias, puede no haber tiempo suficiente para comprobar a fondo si nuevo MSV presenta agentes extraños; en estos casos, la aceptación provisional de una nueva cepa deberá basarse en un análisis del riesgo de la posibilidad de contaminación por agentes extraños en el antígeno que se producirá a partir del nuevo MSV. Esta evaluación del riesgo deberá tener en cuenta las características del proceso, incluido el tipo y concentración de inactivante en el caso de las vacunas inactivadas, para permitir o no la liberación prematura del nuevo producto.

## 2.2. Método de fabricación

### 2.2.1. Procedimiento

El MSV debe propagarse en líneas celulares que se sepa que permiten el crecimiento de los virus de la EEE y la EEO. Véase el capítulo 1.1.8 para más información sobre la preparación y análisis de reservas celulares primarias. Las líneas celulares deben estar libres de virus extraños, bacterias, hongos y micoplasmas. La propagación del virus no debe superar los cinco pases desde el MSV, a no ser que pases posteriores demuestren aportar títulos serológicos suficientes en cobayas.

La línea celular susceptible se siembra en recipientes adecuados. Puede utilizarse medio mínimo esencial suplementado con suero fetal bovino (FBS) como medio para la producción. La incubación tiene lugar a 37°C.

Los cultivos celulares se inoculan directamente con reserva del virus de trabajo de la EEE y la EEO, que en general se encuentra a 1 a 4 pases del MSV. Los cultivos inoculados se incuban durante 1–3 días antes de recolectar el medio de cultivo. Durante la incubación, los cultivos se observan a diario para comprobar si presentan ECP y contaminación bacteriana.

Las vacunas inactivadas pueden inactivarse químicamente con formalina y mezclarse con un adyuvante adecuado. La duración de la inactivación dependerá de la cinética de inactivación observada.

Los conservantes utilizados son timerosal a una dilución de 1/1.000 y antibióticos (neomicina, polimixina, anfotericina B y gentamicina).

### 2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Todos los ingredientes utilizados en la fabricación de la vacuna contra la EEE y la EEO deben estar definidos en protocolos aprobados de fabricación y coincidir entre lotes. Véase el capítulo 1.1.8 para conocer las directrices generales sobre los ingredientes de origen animal. Los ingredientes de origen animal deben proceder de un país con riesgo insignificante de encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET).

### 2.2.3. Controles durante el proceso

En los lotes de producción debe comprobarse a diario si presentan alteraciones citopáticas. Tras la recolección, debe comprobarse si la suspensión de virus presenta contaminación microbiana. Los lotes de producción deben titularse en cultivo tisular antes de la inactivación para estandarizar el producto. Los lotes de título bajo pueden concentrarse o mezclarse con lotes de título alto para lograr el título correcto.

Debe comprobarse si los lotes inactivados están totalmente inactivados, lo cual se realiza utilizando pollitos de entre 6 y 12 horas de vida.

### 2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

#### i) Esterilidad

Las muestras de vacuna inactivada y de vacuna viva se examinan para comprobar si presentan contaminación bacteriana o fúngica. El volumen de medio utilizado en estas pruebas deberá ser suficiente como para contrarrestar los posibles efectos bacteriostático o fungistático de los conservantes del producto. Para la prueba de presencia bacteriana, cada uno de diez recipientes, los cuales contendrán como mínimo 120 ml de medio de digesto caseína soja, se inocula con 0,2 ml extraídos de diez frascos de producto final. Los diez recipientes se incuban a 30–35°C durante 14 días y se observan para comprobar si presentan crecimiento bacteriano. Para la prueba de presencia fúngica, cada uno de diez recipientes, los cuales contendrán como mínimo 40 ml de medio de digesto caseína soja, se inocula con 0,2 ml extraídos de diez frascos de producto final. Los diez recipientes se incuban a 20–25°C durante 14 días y se observan para comprobar si presentan crecimiento fúngico. Es posible que en determinados países existan requisitos propios.

#### ii) Identidad

Deben llevarse a cabo pruebas independientes para cada lote en el caso de que la prueba de potencia del lote, como las titulaciones en cultivo tisular de vacunas de virus vivo no verifiquen suficientemente la identidad del agente patógeno presente en la vacuna. Las pruebas de identidad pueden incluir la inmunofluorescencia o pruebas de neutralización del suero.

#### iii) Seguridad

Las pruebas de seguridad del lote destinadas a comprobar la inactivación del virus se llevan a cabo en pollitos de entre 6 y 12 horas de vida. Se inoculan diez pollitos por vía subcutánea con 0,5 ml de producto y se observan a diario durante 10 días. Si aparecen reacciones desfavorables, el lote resulta inaceptable.

#### iv) Potencia del lote

Las pruebas de potencia se llevan a cabo inoculando diez cobayas con reserva de virus vacunal de la EEE o la EEO, empleando media dosis de caballo en dos ocasiones, con 14-21 días de diferencia, por la vía recomendada para el caballo. Se analizan muestras de suero de cada animal vacunado y control 14-21 días después de la segunda dosis empleando la prueba de la PRN. Los títulos del virus de la EEE deben ser  $\geq 1/40$ , y los títulos del virus de la WEE deben ser  $\geq 1/40$  (US Code of Federal Regulations), empleando células Vero. Si se utilizan fibroblastos de embrión de pato en la prueba de la PRN, los títulos serán inferiores. Una prueba de potencia alternativa es el uso de la exposición intraencefálica, 14-21 días después de la segunda vacunación. Cada cobaya se inocula con 0,1 ml de preparación vírica que contenga 100 DL<sub>50</sub> (dosis letal en el 50% de los



animales expuestos). Se lleva a cabo una titulación simultánea. Para que la vacuna se autorice, el 80% de los cobayas deben sobrevivir a ambos virus.

### 2.3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

#### 2.3.1. Proceso de fabricación

Para registrar vacunas, deben enviarse a las autoridades todos los datos relativos a la fabricación de la misma y a las pruebas de control de calidad (véase el apartado C.2.1 y C.2.2). Esta información será la correspondiente a tres lotes de vacuna consecutivos, con un volumen no inferior a 1/3 del volumen del lote industrial habitual.

Los controles durante el proceso forman parte del proceso de fabricación.

#### 2.3.2. Requisitos de seguridad

La formulación final de la vacuna inactivada deberá comprobarse en un número reducido de animales de destino antes de llevar a cabo un estudio de campo a gran escala. La formulación final de la vacuna no debe causar reacciones adversas.

Deben llevarse a cabo estudios de campo de seguridad para poder aprobar definitivamente una vacuna. En general, deben utilizarse dos series, en tres ubicaciones geográficas distintas y en las condiciones de cría animal habituales, y un mínimo de 600 animales. La vacuna debe administrarse según las recomendaciones de la ficha técnica (incluidas las dosis de refuerzo) y debe contener la cantidad máxima permitida de antígeno vírico. Si no se especifica el contenido máximo en antígeno, las series deberán ser de la potencia post-comercialización habitual prevista. Alrededor de un tercio de los animales deberá tener al menos la edad mínima recomendada para la vacunación.

##### i) Precauciones (peligros)

La vacuna deberá identificarse como inocua o patógena para el personal que la administre. Los fabricantes deberán advertir de forma suficiente que se precisa atención médica en caso de auto-inyección (incluida la de adyuvantes, vacunas en emulsión oleosa, conservantes, etc.), incluyendo advertencias en la ficha técnica/prospecto del producto para que el personal que lo administre sea consciente de todos los peligros.

#### 2.3.3. Requisitos de eficacia

Para registrar una vacuna comercial, debe ponerse de manifiesto la eficacia (la protección que confiere) de un lote o lotes producidos según el método estándar y que contengan la cantidad mínima de antígeno, o bien su valor de potencia, llevando a cabo pruebas de potencia que se realizarán vacunando/analizando mediante serología a cobayas; cada futuro lote comercial deberá analizarse antes de ser liberado, con el fin de garantizar que tiene el mismo valor de potencia que se ha observado en el/los lote/s utilizado/s para la/s prueba/s de eficacia.

#### 2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

Los caballos vacunados pueden desarrollar un título serológico que puede interferir con la posibilidad de exportar el caballo.

#### 2.3.5. Duración de la inmunidad

Sobre la duración de la inmunidad no hay estudios exhaustivos disponibles. Se recomienda una revacunación anual en el caso de la vacuna inactivada. Los potros vacunados antes de un año de edad deben volver a ser vacunados de nuevo antes de la siguiente estación del vector.

#### 2.3.6. Estabilidad

La vacuna liofilizada es estable e inmunogénica durante 2 años si se mantiene refrigerada a 2–7°C. La vacuna debe desecharse después de 2 años.

## BIBLIOGRAFÍA

BAUER R.W., GILL M.S., POSTON R.B. & KIM D. Y. (2005). Naturally occurring eastern equine encephalitis in a Hampshire wether. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 281–285.

- BINGHAM A.M., GRAHAM S.P., BURKETT-CADENA N.D., WHITE G.S., HASSAN H.K. & UNNASCH T.R. (2012). Detection of eastern equine encephalomyelitis virus RNA in North American snakes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **87** (6), 1140–1144.
- BROWN T.M., MITCHELL C.J., NASCI R.S., SMITH G.C. & ROEHRIG J.T. (2001). Detection of eastern equine encephalitis virus in infected mosquitoes using a monoclonal antibody-based antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65**, 208–213.
- ELVINGER F., BALDWIN C.A., LIGGETT A.D., TANK K.N., & STALLKNECHT D.E. (1996). Prevalence of exposure to eastern equine encephalomyelitis virus in domestic and feral swine in Georgia. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 481–484.
- FARRAR M.D., MILLER D. L., BALDWIN C. A., STIVER S. L. & HALL C. L. (2005). Eastern equine encephalitis in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 614–617.
- GUY J.S. (1997). Arbovirus Infections. *In: Diseases of Poultry*, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R., & Saif Y.M., ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 765–772.
- JOHNSON D.J., OSTLUND E.N. & SCHMITT B.J. (2003). Nested multiplex RT-PCR for detection and differentiation of West Nile virus and eastern equine encephalomyelitis virus in brain tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 488–493.
- KARABATSOS N., LEWIS A.L., CALISHER C.H., HUNT A.R. & ROEHRIG J.T. (1988). Identification of Highland J virus from a Florida horse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **39**, 603–606.
- LAMBERT A.J., MARTIN D.A. & LANCIOTTI R.S. (2003). Detection of North American eastern and western equine encephalitis viruses by nucleic acid amplification assays. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 379–385.
- LINSSEN B., KINNEY R.M., AGUILAR P., RUSSELL K.L., WATTS D.M., KAADEN O.R. & PFEFFER M. (2000). Development of reverse transcription-PCR assays specific for detection of equine encephalitis viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 527–535.
- MAIRE L.F. III, MCKINNEY R.W. & COLE F.E. Jr (1970). An inactivated eastern equine encephalomyelitis vaccine propagated in chick-embryo cell culture. I. Production and testing. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **19**, 119–122.
- MCGEE E.D., LITTLETON C.H., MAPP J.B. & BROWN R.J. (1992). Eastern equine encephalomyelitis in an adult cow. *Vet. Pathol.*, **29**, 361–363.
- MONROY A.M., SCOTT T.W. & WEBB B.A. (1996). Evaluation of reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of eastern equine encephalomyelitis virus during vector surveillance. *J. Med. Entomol.*, **33**, 449–457.
- MORRIS C.D. (1989). Eastern equine encephalomyelitis. *In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 3, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1–12.
- PURSELL A.R., MITCHELL F.E. & SEIBOLD H.R. (1976). Naturally occurring and experimentally induced eastern encephalomyelitis in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **169**, 1101–1103.
- PENNICK K.E., MCKNIGHT C.A., PATTERSON J.S., LATIMER K.S., MAES R.K., WISE A.G. & KIUPEL M. (2012). Diagnostic sensitivity and specificity of in situ hybridization and immunohistochemistry for Eastern equine encephalitis virus and West Nile virus in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue of horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24** (2), 333–338.
- REISEN W.K. & MONATH T.P. (1989). Western equine encephalomyelitis. *In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 5, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 89–137.
- SAHU S.P., ALSTAD A.D., PEDERSEN D.D. & PEARSON J.E. (1994). Diagnosis of eastern equine encephalomyelitis virus infection in horses by immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 34–38.
- TATE C.M., HOWERTH E.W., STALLKNECHT D.E., ALLISTON, A.B., FISHER J.R. & MEAD D.G. (2005). Eastern equine encephalitis in a free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Wildl. Dis.*, **41**, 241–245.
- TUTTLE A.D., ANDREADIS T.G., FRASCA S. JR & DUNN J.L. (2005). Eastern equine encephalitis in a flock of African penguins maintained at an aquarium. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **226**, 2059–2062.
- UNITED STATES CODE OF FEDERAL REGULATIONS (2000). Encephalomyelitis vaccine: Eastern and Western killed virus. Title 9, Part 113, Section 113.207. US Government Printing Office, Washington DC, USA, 601–602.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE (1974). A Guide to the Performance of the Standardised Complement Fixation Method and Adaptation to Micro Test. Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (2009). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. (BMBL) 5<sup>th</sup> Edition. <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm>.

VODKIN M.H., McLAUGHLIN G.L., DAY J.F., SHOPE R.E. & NOVAK R.J. (1993). A rapid diagnostic assay for eastern equine encephalomyelitis viral-RNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 772–776.

WALTON T.E. (1981). Venezuelan, eastern, and western encephalomyelitis. *In: Virus Diseases of Food Animals. A World Geography of Epidemiology and Control. Disease Monographs, Vol. 2*, Gibbs E.P.J., ed. Academic Press, New York, USA, 587–625.

WANG E., PAESSLER S., AGUILAR P.V., CARRARA A.S., NI H., GREENE I.P. & WEAVER S.C. (2006). Reverse transcription-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection and differentiation of alphavirus infections. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4000–4008.

WEAVER S.C., HAGENBAUGH A., BELLEW L.A., GOUSSET L., MALLAMPALLI V., HOLLAND J.J. & SCOTT T.W. (1994). Evolution of Alphaviruses in the eastern equine encephalomyelitis complex. *J. Virol.*, **68**, 158–169.

\*

\* \*

**NB:** Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la encefalomiелitis equina (del Este o del Oeste) (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* y en la página web de la OIE, <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>). Para más información sobre pruebas de diagnóstico, reactivos y vacunas para la encefalomiелitis equina (del este y del oeste), por favor contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE.