

## ENCEFALOMIELITIS EQUINA (del Este, del Oeste o venezolana)

---

### RESUMEN

**Descripción e importancia de la enfermedad:** Los virus de la encefalomiелitis equina del Este (EEE), del Oeste (EEO) y venezolana (EEV) pertenecen al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*. Las infecciones alternadas de aves, roedores 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 fortuitos definitivos de la EEO. Los caballos no son hospedadores definitivos del EEV. En los caballos, la enfermedad se caracteriza por la presencia de fiebre, anorexia y depresión intensa. En los casos graves, puede evolucionar hacia la hiperexcitabilidad, ceguera, ataxia, depresión mental grave, postración, convulsiones y muerte.

La infección por EEE en los caballos es a menudo fatal, mientras que EEO puede provocar una enfermedad subclínica o moderada con menos de un 30% de mortalidad. Se ha descrito que tanto el virus de la EEE como el de 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.

El complejo de virus de la encefalomiелitis equina (VEE) está formado por seis subtipos antigénicos (I–VI). Dentro del subtipo I, hay cinco variantes antigénicas (variantes AB-F). Inicialmente, los subtipos I-A y I-B se consideraban variantes claramente diferenciadas, mientras que actualmente se consideran idénticas (I-AB). Las variantes antigénicas I-AB y I-C se asocian a actividad epizootica en équidos y epidémica en humanos. Históricamente, varios brotes han afectado a muchos miles de personas y de équidos. Las otras tres variantes del subtipo I (I-D, I-E, I-F) y los otros cinco subtipos de VEE (II–VI) circulan en ciclos enzoóticos naturales. Los équidos sirven de hospedadores amplificadores a las cepas epizooticas de los VEE, mientras que los VEE enzoóticos circulan cíclicamente sobre todo en roedores salvajes y mosquitos. Las variantes y los subtipos enzoóticos se han considerado no patógenos para los équidos, pero pueden causar enfermedad clínica en el ser humano. Durante 1993 y 1996, se comprobó que algunos brotes de encefalitis equina de México estuvieron causados por VEE enzoóticos del subtipo I-E. Más recientemente, en México, Centroamérica y las partes norte y oeste de Sudamérica se han producido brotes esporádicos. Los subtipos enzoóticos humanos alcanzan zonas más amplias del interior de Centroamérica y Sudamérica (Weaver et al., 2012).

**Identificación del agente:** Se puede realizar un diagnóstico presuntivo de la EEE, la EEO o la EEV 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 macroscópicas 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, los virus EEO y EEV raramente puede aislarse. Los virus 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 puede identificar mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), pruebas de fijación del complemento (FC), inmunofluorescencia o neutralización por reducción de placas (PRN). Se puede llevar a cabo una identificación específica de variantes epizooticas del EEV mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta, con una PRN diferencial empleando anticuerpos monoclonales específicos de subtipo o de variante, o mediante la secuenciación del ácido nucleico.

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

**Requisitos para las vacunas:** Las vacunas frente a la EEE o la EEO son seguras e inmunogénicas. Las únicas vacunas recomendadas frente a la EEV son vacunas de virus atenuados, creadas con la cepa TC-83, o bien preparaciones víricas inactivadas preparadas también a partir de dicha cepa. El virus atenuado es inmunógeno cuando se administra por vía intramuscular, y puede causar reacciones adversas en el receptor.

Las preparaciones víricas de EEV virulento inactivadas con formalina no deben utilizarse en équidos, puesto que puede quedar virus virulento residual tras el tratamiento con formalina, y por lo tanto pueden causar enfermedad grave tanto en animales como en personas. Ha habido epizootias de EEV debidas al uso de dichos virus tratados con formalina.

## A. INTRODUCCIÓN

Los virus de la encefalomiелitis equina del Este (EEE), la del Oeste (EEO) y la venezolana (EEV) son miembros del género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*. La ecología natural para el mantenimiento del virus tiene lugar debido a la infección alterna de aves (roedores en el caso de la EEV) y mosquitos. 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 fortuitos definitivos del virus de la EEV. La EEE se ha diagnosticado en Quebec y Ontario en Canadá, en las regiones central y oriental de los Estados Unidos de América (EE.UU.), las Islas del Caribe, México, y América Central y del Sur. Las cepas de América del Sur del virus de la EEE, anteriormente denominadas linajes II, III y IV, actualmente se conocen como virus Madariaga (Arrigo, 2010); el cambio se produjo después de que las cepas que causaron los brotes de Darien, Panamá, en 2010 (Carrera, 2013), condujeran a la re-evaluación de la secuenciación vírica y a la reclasificación de las cepas víricas.

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).

El complejo de virus VEE está formado por seis subtipos antigénicos (I–VI). Dentro del subtipo I, hay cinco variantes antigénicas (variantes AB-F), de las cuales, I-A y I-B se asocian a actividad epizootica en équidos y a epidemias actuales en humanos (Calisher *et al.*, 1980; Monath & Trent, 1981; Pan-American Health Organization, 1972; Walton, 1981; Walton *et al.*, 1973; Walton & Grayson, 1989). Inicialmente, los subtipos I-A y I-B se consideraban variantes claramente diferenciadas, pero ahora se consideran idénticos (I-AB). Las variantes epizooticas I-AB y I-C se considera que se originaron en mutaciones del serotipo 1-D enzoótico (Weaver *et al.*, 2004); las variantes aisladas I-AB y I-C solo se han obtenido durante epizootias equinas. Las cepas enzoóticas incluyen las variantes I-D, I-E e I-F del subtipo I, el subtipo II, cuatro variantes antigénicas (A-D) del subtipo III y los subtipos IV-VI. Normalmente, los virus VEE enzoóticos no producen encefalomiелitis clínica en las especies equinas (Walton *et al.*, 1973), pero en 1993 y en 1996, en México, el subtipo enzoótico 1-E causó epizootias limitadas en caballos. Las variantes y los subtipos enzoóticos pueden causar enfermedad clínica en humanos (Monath & Trent, 1981; Pan-American Health Organization, 1972; Powers *et al.*, 1997; Walton, 1981; Walton & Grayson, 1989).

Históricamente, los VEE epizooticos se limitaron a las partes norte y oeste de Sudamérica (Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Trinidad) (Pan-American Health Organization, 1972). Sin embargo, entre 1969 y 1972, se produjo actividad epizootica (variante 1-AB) en Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y EE. UU. (Texas). En EE.UU. y México no se han producido epizootias de VEE causadas por virus I-AB o I-C desde 1972. Las cepas equinas y humanas de VEE epizooticos fueron cepas del subtipo I-C de Venezuela en 1993, 1995, 1996, 1999, 2000 y 2003 (Navarro *et al.*, 2005) y de Colombia en 1995. Asimismo, la variante 1-AB se ha aislado de hámsteres centinela en Venezuela (Medina *et al.*, 2015).

Se hallan focos de variantes y subtipos enzoóticos en zonas clasificadas como bosque húmedo tropical, es decir, zonas con un alto nivel freático o zonas pantanosas abiertas con arroyos soleados serpenteantes. Son zonas de las Américas en las cuales las lluvias se distribuyen a lo largo de todo el año o zonas permanentemente lluviosas. Los virus enzoóticos circulan en ciclos entre roedores, y en ocasiones aves, debido al acto alimentario de los mosquitos (Monath & Trent, 1981; Pan-American Health Organization, 1972; Walton, 1981; Walton & Grayson, 1989). Se han identificado cepas víricas de VEE enzoóticos en los Everglades de Florida (subtipo II), México (variante I-E), ciertos países de Centroamérica (variante I-E), Panamá (variantes I-D y I-E), Venezuela

(variante I-D), Colombia (variante I-D), Perú (variantes 1-D, III-C y III-D), la Guayana Francesa (variante III-B y subtipo V), Ecuador (variante I-D), Bolivia (variante I-D), Surinam (variante III-A), Trinidad (variante III-A), Brasil (variantes I-F y III-A y subtipo IV) y Argentina (subtipo VI). En un nicho ecológico atípico, se ha aislado la variante III-B en EE.UU. (Colorado y Dakota del Sur) en una asociación poco habitual con aves (Aguilar *et al.*, 2009; Monath & Trent, 1981; Pan-American Health Organization, 1972; Walton, 1981; Walton & Grayson, 1989). El virus de los Everglades es un VEE del subtipo II que infecta a roedores y a perros en Florida.

Los signos clínicos de la EEE, la EEO y la EEV 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 preliminar de la encefalomiелitis vírica equina 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 la causada por el virus del Nilo occidental (Capítulo 3.1.24), la rabia (Capítulo 3.1.17) y otras enfermedades infecciosas, parasitarias o no infecciosas, pueden ocasionar signos clínicos parecidos, y el diagnóstico debe confirmarse mediante las pruebas que se describen.

La infección por el virus de la EEO se ha observado en una amplia zona geográfica, p. ej. casos esporádicos en más de 2590 km<sup>2</sup>, aunque desde 1999 no se ha atribuido ningún brote de la enfermedad a EEO. 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 la 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 ha descrito enfermedad clínica y muerte por EEE y EEO en 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, 2009). 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.

Las infecciones humanas por virus VEE se originan por transmisiones por aerosol de restos de jaulas de roedores de laboratorio infectados y por accidentes de laboratorio. Existen casos de trabajadores de laboratorio que han contraído infecciones por variantes y subtipos tanto epizoóticos como enzoóticos (American Committee on Arthropod-Borne Viruses [ACAV], 1980). En los humanos, pueden tener lugar enfermedad clínica grave o la muerte. El personal que manipula virus VEE infeccioso o los respectivos antígenos preparados a partir de tejidos o cultivos celulares infectados debe estar vacunado o demostrar que tiene anticuerpos neutralizantes específicos de los VEE (Berge *et al.*, 1961; Pan-American Health Organization, 1972). Si la vacunación no es viable, se recomienda que en todo procedimiento se emplee equipo de protección personal adicional que incluya protección respiratoria. Las manipulaciones de laboratorio deben llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y de contención adecuado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo (véase el capítulo 1.1.4).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la EEE, la EEO y la EEV, y su propósito<sup>1</sup>

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente<sup>2</sup></b>						
RT-PCR	–	++	n/a	+++	–	–
Aislamiento en cultivo celular	–	++	n/a	+++	–	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
ELISA de captura de IgM	–	+	n/a	++	–	–
Neutralización por reducción de placas	+++	+	n/a	++	+++	+++
Inhibición de la hemaglutinación (muestras pareadas)	+	++	n/a	++	++	++
Fijación del complemento (muestras pareadas)	–	+	n/a	++	–	–

Clave: +++ = método recomendado, validado para este propósito; ++ = método idóneo pero que puede precisar una posterior validación; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable.

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

IgM ELISA = enzimoimmunoanálisis de inmunoglobulina M

### 1. Identificación del agente

#### 1.1. Cultivo *in-vitro* e *in-vivo*

El método definitivo para el diagnóstico de la EEE o la EEO consiste en el aislamiento seguido de la tipificación. 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. Durante la infección por el virus de la EEO, la viremia coincide con el inicio de la pirexia en un plazo máximo de 12–24 horas tras la infección. La viremia suele terminar 5–6 días después del inicio de la infección, y coincide con la producción de anticuerpos neutralizantes y la aparición de signos clínicos neurológicos. A menudo, los virus de la EEO no puede aislarse a partir del encéfalo de los équidos infectados. De los animales febriles que se hallen en estrecho contacto con los casos de encefalitis clínica, deben extraerse muestras de sangre para el aislamiento del virus. Se recomienda recoger un

1 En el caso de la EEO y la VEEV, no todas las pruebas se han evaluado exhaustivamente en caballos infectados de forma natural.

2 Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

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, la EEO y la EEV 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, la monocapa celular se lava dos veces con medio de cultivo, y se añade medio de mantenimiento. Se incuban los cultivos durante 6–8 días, y se realiza un pase ciego. Los virus de la EEE, la EEO y la EEV 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 intracranalmente 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, la EEO y la EEV. 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.

Las cepas víricas aisladas se pueden identificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta o directa o mediante la prueba de la neutralización por reducción de placas (PRN) empleando anticuerpos policlonales o monoclonales contra virus específicos, los cuales pueden obtenerse por adquisición comercial o bien preparándolos a partir de una hiperinmunización de animales, la posterior extracción del respectivo suero (o líquido ascítico en el caso de los ratones) y la purificación de las globulinas.

## 1.2. Métodos moleculares – detección de ácido nucleico

### 1.2.1. PCR convencional con transcripción inversa

Se han descrito varios métodos RT-PCR para detectar ARN del virus de la EEE, la EEO y la EEV en mosquitos y tejidos de vertebrados, aunque solo unos pocos han sido ampliamente validados para muestras de mamíferos (Linssen *et al.*, 2000; Monroy *et al.*, 1996; Vodkin *et al.*, 1993). Se desarrolló un método de RT-PCR múltiple anidada para realizar un diagnóstico diferenciado en casos sospechosos de EEE o encefalomiелitis arbovírica 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 mucho en los laboratorios del servicio nacional veterinario de EE.UU. (*National Veterinary Service Laboratories* [NVSL]) durante varias estaciones consecutivas de arbovirus.

En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los cebadores empleados en NVSL para la detección de ARN vírico de los virus de la EEE, EEO y EEV. La primera reacción se lleva a

cabo en un tubo y empieza con transcripción inversa a 46–50°C (dependiendo del intervalo de temperatura óptima de la enzima que se utilice) durante 30 minutos seguida de activación de la polimerasa a 95°C durante 15 minutos. A continuación, se llevan a cabo 35 ciclos que consisten en desnaturalización a 94°C durante 45 segundos; hibridación a 58°C durante 45 segundos y prolongación a 72°C durante 1 minuto. Al final de la reacción, se aplica un paso más de prolongación a 72 durante 9 minutos. La PCR anidada emplea 1 µl del primer producto de la PCR en 50 µl de mezcla de reacción, y se ejecuta en las siguientes condiciones de ciclado: activación de la polimerasa a 95°C durante 15 minutos, 35 ciclos de los pasos descritos arriba con una temperatura de hibridación de 46°C, seguidos de la prolongación final a 72°C durante 9 minutos.

También se desarrolló un método destinado a detectar distintas variantes de virus VEE empleando un par de cebadores degenerados (Tabla 2) (Pisano *et al.*, 2012). Después de la transcripción inversa a 46-50°C (dependiendo de la enzima que se utilice) durante 30 minutos y la desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, los autores recomiendan una primera PCR (40 ciclos) que consiste en la desnaturalización a 94°C durante 30 segundos; hibridación a 64°C durante 60 segundos; y prolongación a 72°C durante 30 segundos, complementada con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Para la reacción anidada, se mezclan 2 µl del producto de la primera PCR con 50 µl de mezcla de reacción y se someten a una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación que consisten en la desnaturalización a 94°C durante 30 segundos; hibridación a 61°C durante 40 segundos; y prolongación a 72°C durante 30 segundos. A continuación, se aplica una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados para la detección de ARN vírico de EEE, EEO y EEV mediante RT-PCR anidada.

Virus	Posición en el genoma	Longitud del amplicón	Secuencia del cebador (5' – 3')	Fuente
EEE (1ª fase)	9233–9797	565	F: AGG-GCT-TAC-CTG-ATT-GAC R: GTA-ACG-CCA-GGA-GTA-TTG	NVSL
EEE (anidada)	9571–9710	140	F: GGC-TCA-AGA-GTC-AGG-AGA R: CGG-ATG-TGA-CAC-AAG-AGA	NVSL
EEO (1ª fase)	9032–9621	590	F: TAA-GTG-TGG-CGA-CTA-CAG R: TCA-GGC-AGT-CTC-TTC-TTG	NVSL
EEO (anidada)	9241–9575	335	F: CTC-ACA-CGC-CTA-CAG-TCA R: AGT-GCC-TAC-CAG-GAT-AGC	NVSL
EEV I-AB/C/D (1ª fase)	9215–9776	562	F: AGC-CAG-TGC-ACA-AAG-AAG R: TAG-GTG-TTA-GCC-GGT-AAG	NVSL
EEV I-AB/C/D (anidada)	9536–9671	136	F: GGG-TGG-GAG-TTT-GTA-TGG R: CCA-GGA-TGG-TGG-ACA-TAG	NVSL
EEV I-E (1ª fase)	9611–10085	475	F: GTA-ATC-CAC-ACG-GAC-TAC R: GCA-TAA-CCC-GCT-CTG-TTG	NVSL
EEV I-E (anidada)	9794–9955	162	F: GCA-TGC-CTC-TGT-GCT-TAG R: ATT-TCA-GCA-AGC-GGG-TAG	NVSL
EEV todos (1ª fase)	45–176	156	F: ATG-GAG-AAR-GTT-CAC-GTT-GAY-ATC-G R: YTC-GAT-YAR-YTT-NGA-NGC-YAR-ATG-C	Pisano <i>et al.</i> , 2012
EEV todos (anidada)	83–163	80	F: ARG-AYA-GYC-CNT-TCC-TYM-GAG-C R: CRT-TAG-CAT-GGT-CRT-TRT-CNG-TNA-C	Pisano <i>et al.</i> , 2012

F: directo; R: inverso.

Se ha descrito una detección mediante RT-PCR múltiple en tiempo real del ARN vírico de los virus de la EEE y la EEO (Kang *et al.*, 2010), pero este método no se ha evaluado a fondo con muestras de campo. También se ha descrito una combinación de RT-PCR con enzimoimmunoanálisis (ELISA: RT-PCR-ELISA) como método para identificar alfavirus que son patógenos para el ser humano (Wang *et al.*, 2006).

### 1.2.2. PCR en tiempo real con transcripción inversa

Se ha desarrollado y validado con un conjunto pequeño de muestras de campo una RT-PCR en tiempo real sensible para la detección de variantes de Norteamérica de ARN de virus de la EEE y la EEO, y ha mostrado una sensibilidad superior a la del aislamiento del virus en cultivo de células Vero (Lambert *et al.*, 2003). Los cebadores y las sondas (Tabla 3) se evaluaron con un conjunto de estructuras de ARN sintético que incorporaban distintas sustituciones presentes en variantes de virus de la EEE y la EEO de Norteamérica (Vina-Rodríguez *et al.*, 2016). Ello confirmó la alta sensibilidad y especificidad de los reactivos desarrollados por Lambert *et al.* (2003). La RT-PCR en tiempo real empieza con una transcripción inversa a 46–50°C (dependiendo de la enzima que se utilice) durante 30 minutos seguida de una activación de la polimerasa *Taq* a 95°C durante 15 minutos. A continuación, se ejecutan 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y prolongación a 72°C durante 30 segundos.

Se ha evaluado una RT-PCR en tiempo real de reciente creación para la detección de VEE (Vina-Rodríguez *et al.*, 2016) con un conjunto de oligonucleótidos de ARN sintético, y precisa una posterior validación con muestras de campo de VEE. Esto es especialmente importante porque la zona del genoma nsP1 donde se han seleccionado los cebadores y las sondas está muy conservada en los alfavirus (Eshoo *et al.*, 2007) y, por lo tanto, debe descartarse la posibilidad de una reacción cruzada no deseada.

**Tabla 3.** Cebadores y sondas de la RT-PCR en tiempo real para virus de la EEE y la EEO. Ambas sondas están marcadas con FAM y silenciadas con BHQ1 (Lambert *et al.*, 2003).

Virus	Nombre del reactivo	Posición en el genoma	Secuencia (5'–3')	Longitud del amplicón
EEE	EEE 9391, cebador F	9391–9411	ACA-CCG-CAC-CCT-GAT-TTT-ACA	69
	EEE 9459c, cebador R	9459–9439	CTT-CCA-AGT-GAC-CTG-GTC-GTC	
	EEE 9414 Sonda	9414–9434	TGC-ACC-CGG-ACC-ATC-CGA-CCT	
WEE	WEE 10,248 cebador F	10,248–10,267	CTG-AAA-GTC-GGC-CTG-CGT-AT	67
	WEE 10,314c cebador R	10,314–10,295	CGC-CAT-TGA-CGA-ACG-TAT-CC	
	WEE 10,271	10,271–10,293	ATA-CGG-CAA-TAC-CAC-CGC-GCA-CC	

F: directo; R: inverso.

### 1.3. Detección de antígeno

Se ha desarrollado un ELISA de captura de antígeno para la vigilancia de la EEE en mosquitos. Se puede utilizar en países que no disponen de instalaciones para el aislamiento de virus o de RT-PCR (Brown *et al.*, 2001). Los procedimientos de inmunohistoquímica (IHC) son muy útiles para el diagnóstico de la EEE porque se llevan a cabo en tejidos fijados (Pennick *et al.*, 2012). En la IHC, la diana es una proteína de envoltura del virus de la EEE. Se examinan zonas necróticas e inflamadas del encéfalo. En caballos infectados por el virus de la EEE, se observa una tinción positiva sobre todo en las neuronas y en dendritas relacionadas. No obstante, el no identificar el antígeno vírico en el sistema nervioso central equino no descarta la infección.

## 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 puede indicar una infección aguda o una exposición reciente al virus y, por lo tanto, los resultados de la serología deben interpretarse en función de los signos clínicos y de la situación epizootica (Sahu *et al.*, 1994). Para interpretar los resultados de cualquier prueba serológica también debe tenerse en cuenta el historial de vacunación, sobre todo en el caso de la PRN y de la neutralización del virus (VN). Además, puede haber reacciones cruzadas entre los anticuerpos contra los virus de la EEE y de la EEO en pruebas como la fijación del complemento (FC) y la inhibición de la hemaglutinación (HI). Los anticuerpos contra los virus de la EEE y la EEO que detecta la FC aparecen más tarde y no persisten, motivo por el cual esta prueba 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 caolín 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 caolín 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>3</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 enzimoimmunoanálisis

Existen a la venta varios kits para la detección de IgM en muestras equinas. La técnica ELISA se realiza recubriendo las placas de fondo plano con un anticuerpo anti IgM equina de captura (Sahu *et al.*, 1994). El ejemplo siguiente aporta una descripción general del procedimiento, que puede variar según las recomendaciones del fabricante, destinadas a lograr el equilibrio óptimo entre sensibilidad y especificidad de la prueba.

El anticuerpo anti IgM equina se diluye en tampón carbonato 0,5 M, pH 9,6, y se añaden 50-100 µl de esta solución a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. 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 añaden 200 µl/pocillo de PBS/Tween/leche desnatada en polvo al 5% (u otro reactivo bloqueante), 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. 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 antígeno vírico utilizado conjugado con peroxidasa de rábano. Las placas se incuban durante 60-90 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 (0,1%), y se incuban las placas a temperatura ambiente durante 15-40 minutos. La absorbancia lumínica 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 control negativo. Para asegurar la especificidad, cada muestra de suero se analiza para determinar la reactividad ante el antígeno vírico y ante el antígeno control.

### 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, la EEO y la EEV. 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 a continuación corresponden a los frascos, y se deben reducir a la mitad si se van a utilizar placas con seis pocillos. Antes de proceder al análisis, el suero se inactiva por calor sometiéndolo a 56°C durante 30 minutos. Se pueden analizar a una dilución final de 1/10 y 1/100. Los puntos finales pueden establecerse empleando la PRN o la IH si se va a trabajar con diluciones séricas seriadas (por ejemplo, a la mitad, a una quinta parte, a una décima parte, etc). Esto es especialmente útil en el caso de las muestras pareadas extraídas de un animal con varios días o semanas de diferencia entre la primera y la segunda. El suero que se utiliza en la prueba PRN se prueba frente a 100 unidades formadoras de placa (UFP) víricas (50 UFP en el caso de las 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 1 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.

3 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.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

### 1. Antecedentes

Existen a la venta vacunas inactivadas frente a los virus de la EEE y la EEO. 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, herpesvirus inactivados (VH-1 y VH-4) 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 vacunas recomendadas contra la infección por el virus de la EEV son una vacuna vírica atenuada, con la cepa TC-83, y una preparación vírica inactivada a partir de la misma cepa (Monath & Trent, 1981; Pan-American Health Organization, 1972; Walton, 1981; Walton & Grayson, 1989). Deben seguirse las instrucciones de uso del producto comercial.

La vacuna inactivada debe administrarse en dos dosis con un intervalo de 2-4 semanas entre ambas. Se recomienda una revacunación anual a no ser que el prospecto del fabricante indique lo contrario.

La vacuna atenuada debe reconstituirse con solución salina fisiológica y administrarse de inmediato. Mientras se esté utilizando la vacuna, los viales multidosis deben conservarse sobre hielo. Toda vacuna no utilizada en un plazo máximo de 4 horas tras la reconstitución, debe desecharse por medios adecuados. Los animales de más de 3 meses se vacunan por vía subcutánea en la región cervical y con una dosis única. Se recomienda una revacunación anual.

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  $-70^{\circ}\text{C}$  en estado liofilizado.

##### 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.

La cepa vacunal TC-83 de la vacuna contra el virus de la EEV se originó de la cepa de asno de Trinidad (una variante de I-AB) del virus de la EEV epizoótica aislado en 1944. Esta cepa deriva de un pase seriado de la cepa de asno de Trinidad por células de corazón de feto de cobaya. Es segura e inmunógena al número de pases establecido, e induce inmunidad protectora en équidos vacunados, aunque a veces pueden producirse reacciones adversas. Esta vacuna se desarrolló inicialmente para su uso en personal relacionado con la investigación de alto riesgo del virus de la EEV.

##### 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)**

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, la EEO y la EEV. 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, la EEO y la EEV, 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, gentamicina y otros).

### **2.2.2. Requisitos para los ingredientes**

Todos los ingredientes utilizados en la fabricación de las vacunas contra la EEE, la EEO y la EEV 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, la EEO o la EEV, 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  $\geq 1/40$ , los títulos del virus de la EEO deben ser  $\geq 1/40$ , y los títulos del virus de la EEV deben ser de  $\geq 1/4$  (US Code of Federal Regulations, 2000), 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. Deben respetarse las fechas de caducidad recomendadas que constan en el envase.

## BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR P.V., ADAMS A.P., SUÁREZ V., BEINGOLEA L., VARGAS J., MANOCK S., FREIRE J., ESPINOZA W.R., FELICES V., DIAZ A., LIANG X., ROCA Y., WEAVER S.C. & KOCHER T.J. (2009). Genetic characterization of Venezuelan equine encephalitis virus from Bolivia, Ecuador and Peru: identification of a new subtype ID lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **3**, e514.

AMERICAN COMMITTEE ON ARTHROPOD-BORNE VIRUSES (ACAV), SUBCOMMITTEE ON ARBOVIRUS LABORATORY SAFETY (1980). Laboratory safety for arboviruses and certain viruses of vertebrates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**, 1359–1381.

ARRIGO N.C., ADAMS, A.P. & WEAVER S.C. (2010) Evolutionary patterns of eastern equine encephalitis virus in North versus South America suggest ecological differences and taxonomic revision. *J. Virol.*, **84**, 1014–1025.

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.

BERGE T.O., BANKS I.S. & TIGERTT W.D. (1961). Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by *in vitro* cultivation in guinea pig heart cells. *Am. J. Hyg.*, **73**, 209–218.

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**, 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.
- CALISHER C.H., SHOPE R.E., BRANDT W., CASALS J., KARABATSOS N., MURPHY F.A., TESH R.B. & WIEBE M.E. (1980). Proposed antigenic classification of registered arboviruses. I. *Togavirus Alphavirus*. *Intervirology*, **14**, 229–232.
- CARRERA J.-P., FORRESTER N., WANG E., VITTOR A.Y., HADDOW A.D., LÓPEZ-VERGÉS S., ABADÍA I., CASTAÑO E., SOSA N., BÁEZ C., ESTRIPEAUT D., DÍAZ Y., BELTRÁN D., CISNEROS J., CEDEÑO H. G., TRAVASSOS DA ROSA A.P., HERNANDEZ H., MARTÍNEZ-TORRES A.O., TESH R.B. & WEAVER S.C. (2013). Eastern Equine Encephalitis in Latin America. *N. Engl. J. Med.*, **369**, 732–744.
- 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.
- ESHOO M.W., WHITEHOUSE C.A., ZOLL S.T., MASSIRE C., PENNELLA T.T., BLYN L.B., SAMPATH R., HALL T.A., ECKER J.A., DESAI A., WASIELOSKI L.P., LI F., TURELL M.J., SCHINK A., RUDNICK K., OTERO G., WEAVER S.C., LUDWIG G.V., HOFSTADLER S.A. & ECKER D.J. (2007). Direct broad-range detection of alphaviruses in mosquito extracts. *Virology*, **368**, 286–295.
- 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.
- KANG X., LI Y., LIU H., LIN F., CAI X., SUN T., CHANG G., ZHU Q. & YANG Y. (2010). A duplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for detecting western equine and eastern equine encephalitis viruses. *Virology*, **7**, 284.
- 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.
- MEDINA G., GARZARO D.J., BARRIOS M., AUGUSTE A.J., WEAVER S.C. & PUJOL F.H. (2015). Genetic diversity of Venezuelan alphaviruses and circulation of a Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB strain during an interepizootic period. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **93**, 7–10.
- MONATH T.P. & TRENT D.W. (1981). Togaviral diseases of domestic animals. *Comp. Diagn. Vir. Dis.*, **4**, 331–440.
- 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.

- NAVARRO J.C., MEDINA G., VASQUEZ C., COFFEY L.L., WANG E., SUÁREZ A., BIOD H., SALAS M. & WEAVER S.C. (2005). Postepizootic persistence of Venezuelan equine encephalitis virus, Venezuela. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1907–1915.
- PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (1972). Venezuelan encephalitis. *In: Proceedings of a Workshop/Symposium on Venezuelan Encephalitis Virus*. Sci. Publ. **243**, Washington DC, USA, 416 pp.
- 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**, 333–338.
- PISANO M.B., SECO M.P., RÉ V.E., FARIAS A.A., CONTIGIANI M.S. & TENORIO A. (2012). Specific detection of all members of the Venezuelan equine encephalitis complex: development of a RT-nested PCR. *J Virol Methods*. **186**, 203-6.
- POWERS A.M., OBERSTE M.S., BRAULT A.C., RICO-HESSE R., SCHMURA S.M., SMITH J.F., KANG W, SWEENEY W.P. & WEAVER S.C. (1997). Repeated emergence of epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis from a single genotype of enzootic subtype ID virus. *J. Virol.*, **71**, 6697–6705.
- 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.
- 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 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>.
- VINA-RODRIGUEZ A., EIDEN M., KELLER M., HINRICHS W. & GROSCUP M.H. (2016). A quantitative real-time RT-PCR assay for the detection of Venezuelan equine encephalitis virus utilizing a universal alphavirus control RNA. *Biomed Res Int.*, 8543204.
- 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.
- WALTON T.E., ALVAREZ O. JR, BUCKWALTER R.M. & JOHNSON K.M. (1973). Experimental infection of horses with enzootic and epizootic strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J. Infect. Dis.*, **128**, 271–282.
- WALTON T.E. & GRAYSON M.A. (1989). Chapter 46. Venezuelan equine encephalomyelitis. *In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 4, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 203–231.
- 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., FERRO C., BARREREA R. BOSCHELL J. & NAVARRO J.C. (2004) Venezuelan equine encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.*, **49**, 141–174.

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.

WEAVER S.C., WINEGAR R., MANGER I.D. & FORRESTER N.L. (2012). Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Res.*, **94**, 242–257.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Encefalomiелitis equina (del Este, del Oeste y venezolana) (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, del Oeste y venezolana), por favor contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

**NB:** EL CAPÍTULO SOBRE LA ENCEFALOMIELITIS EQUINA (DEL ESTE Y DEL OESTE) FUE ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991; EL CAPÍTULO SOBRE LA ENCEFALOMIELITIS VENEZOLANA FUE ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2019.