

RELACIONES INMUNOLOGICAS ENTRE EL VIRUS ENCEFALOMIELITICO EQUINO DE COLOMBIA Y EL DE VENEZUELA

Por el Dr. VLADIMIR KUBES (1)

La existencia de la encefalomi-
elitis infecciosa de los equinos en
Colombia data, según parece, del
año de 1935, cuando dicha enfer-
medad fue registrada en los departa-
mentos del Valle, Tolima, Bolí-
var y Huila (1). Considerémosla en-
tonces como enfermedad de Borna.

A principios del año de 1936, pu-
do observársela en algunas regio-
nes del Departamento del Magda-
lena, y luégo, según se desprende
de los informes oficiales competen-
tes (5), en la parte colombiana de
la Península de La Guajira. A me-
diados del mismo año, la enferme-
dad hizo su primera aparición en
el territorio venezolano, Península
de La Guajira (2), de donde luégo,
en los años 37, 38 y 39, se extendió
prácticamente a través de toda Ve-
nezuela. En los años subsiguientes,
tanto en Colombia como en Vene-
zuela, la enfermedad tuvo carácter
más bien esporádico, para tomar de
nuevo forma epizootica a fines del
año de 1942.

Tomando en cuenta los datos epi-
zootológicos que anteceden, se ha
sospechado desde el principio que
el agente etiológico de la encefalo-
mielitis equina en las dos repúbli-
cas, sea inmunológicamente muy
similar, si no idéntico. No obstan-
te, los estudios experimentales
comparativos se han podido iniciar
sólo recientemente, al disponerse
de ambos virus.

El virus encefalomiélico equino
de Venezuela fue aislado por pri-
mera vez en el año de 1938 por Ku-

bes y Ríos (3), quienes a la vez de-
terminaron sus características in-
munológicas *sui generis*, diferentes
de las de los demás virus encefalo-
miélicos equinos conocidos a la
sazón en el continente americano
(virus Este, Oeste y argentino).
Desde entonces el virus encefalo-
miélico de Venezuela ha sido ob-
jeto de estudios inmunológicos por
varios autores, llegándose en todos
ellos a confirmar los resultados ya
citados. El más amplio de estos es-
tudios es el publicado por el autor
y uno de sus colaboradores en el
año de 1942 (4), donde está tam-
bién incluida la demás literatura
pertinente.

En cuanto al virus encefaliomié-
lico equino de Colombia, fue ais-
lado por Soriano Lleras y L. Figue-
roa en 1941 (7). Por cortesía del
primero, nos ha sido posible obte-
ner el citado virus, a fin de realizar
los estudios de inmunidad cruzada
entre éste y el de Venezuela. Esta
investigación se expone a conti-
nuación.

Técnica y materiales

Todos los trabajos se llevaron a
cabo en ratones blancos suizos de
igual edad y de peso uniforme de
20 grs. En los experimentos, mitad
de ellos inmunizóse, por medio de
la vacuna preparada en embrión de

(1) Director del Instituto de Investi-
gaciones Veterinarias, Ministerio de
Agricultura y Cría, Caracas Venezuela.

pollo, contra el virus encefalomielítico colombiano, y mitad contra el venezolano, inoculando luégo, en forma cruzada, los correspondientes virus de prueba, además de los controles del caso. Los cálculos sobre dosis mortales mínimas (M. L. D.), respectivamente sobre protección, fueron realizados según el método de Reed y Muench (6).

En cuanto a los materiales de estudio, se utilizaron los siguientes:

1º—**Virus encefalomielítico equino de Venezuela V-1938.**—La cepa fue aislada en el año de 1938, en el fundo San Jacinto del Estado Aragua. A pesar de haber sufrido desde entonces numerosos pases por animales de experimentación, inclusive embrión de pollo, continúa conservando todas sus características de patogenia, inmunidad, etc., originales.

2º **Virus encefalomielítico equino de Colombia.**—Se aisló en Bogotá en febrero de 1941, en ocasión de un brote de encefalomielitis equina ocurrido en algunas haciendas cercanas a dicha capital. Fue recibido por nuestros laboratorios en forma de cerebros encefalomielíticos de cobayos conservados en glicerina, en septiembre de 1942. Inoculado en cobayos, ratones y embrión de pollo, su comportamiento ha sido muy parecido al del virus de Venezuela. Cerebros de ratones probados en animales de la misma especie (inoculación intracraneal de 0,02 c.c.) registraron títulos muy altos del virus, tales como 10-8 y 10-10. Estas titulaciones se realizaron siempre con la mezcla de varios cerebros, a fin de evitar variaciones del título netamente individuales (desde 10-4 hasta 10-14), fenómeno por cierto muy frecuente en ratones. Este mismo fenómeno es propio también del virus encefalomielítico de Venezuela. En cuanto al cultivo del virus colombiano en embrión de pollo, tampoco ocurrió diferencia del de Vene-

zuela. En efecto, los títulos medios en ellos logrados han sido 10-6 y 10-8 (titulación hecha en ratones).

3º **Vacuna embrional para uso intradérmico elaborada con el virus encefalomielítico equino de Venezuela.**—Se empleó el lote N° 128, correspondiente a la corriente elaboración del Instituto. Titulado el virus de la papilla embrional antes de transformarla en vacuna, ésta ha sido mortal para ratones inoculados intracranealmente, hasta la dilución de 10-6.

4º **Vacuna embrional para uso intradérmico elaborada con el virus encefalomielítico equino de Colombia.**—Trátase de un lote especial. Ha sido preparado con el virus colombiano arriba citado, en igual forma y simultáneamente con la vacuna anterior. Debido a que el título de la papilla embrional destinada a la vacuna ha sido igualmente de 10-6, sería de presumir que la potencialidad inmunizante de ambos productos ha sido más o menos igual.

PARTE EXPERIMENTAL

Ensayo N° 1

Se prepararon 2 grupos de ratones. Uno de ellos se inmunizó con la vacuna anti-encefalomielítica hecha con virus de Colombia, mientras que el otro con la del virus de Venezuela. La inmunización consistía en 3 inyecciones subcutáneas de 0,02 c.c. cada una, aplicadas a los ratones cada 1º, 4º y 7º día. Catorce días después de la última inyección inmunizante, los animales recibieron, por vía intracraneal y en diluciones escalonadas, el virus (1). Este último consistía siempre en suspensión cerebral de ra-

(1) La máxima inmunidad corresponde generalmente al lapso entre el 2º y 10º día, a partir de la tercera vacunación. Luégo empieza su gradual descenso.

tón preparada en solución fisiológica. En la elaboración de las diluciones escalonadas, partióse siempre del líquido supernatante logrado con la centrifugación de la suspensión encefalomiélica cerebral **standard** de 1:10. La cantidad inoculada fue en todo caso de 0.02 c.c. Simultáneamente con los ratones inmunizados, se inocularon otros no tratados para servir de controles. La observación de los animales se continuó por espacio de 20 días, a partir del día de la inoculación intracraneal del virus. Los demás detalles del experimento aparecen en los cuadros Nros. 1 y 2.

En el primero de ellos se analiza, enfrente de las dos citadas vacunas, el virus encefalomiélico colombiano. Las suspensiones cerebrales contentivas de dicho virus tuvieron título relativamente bajo, según lo dejan entrever los controles. En efecto, la dosis mínima mortal (1 M.L.D.) correspondía a la dilución de 1:100.000, según Reed y Muench. En cuanto a los resultados inmunizantes, ambas vacunas protegieron contra el citado virus, aunque no en intensidad igual. En efecto, los ratones inmunizados con la primera vacuna—la homóloga—, elaborada con virus de Colombia, soportaron de él 71 M.L.D., y los con la otra —no homóloga—, 2.127 M.L.D. Esto quiere decir que la última vacuna, hecha con virus de Venezuela, protegió contra el virus colombiano mejor que la propia vacuna homóloga.

Veamos ahora el cuadro N^o 2, donde las mismas dos vacunas fueron probadas enfrente del virus encefalomiélico venezolano. La suspensión cerebral al efecto utilizada tuvo título bastante alto. En efecto, 1 M.L.D. correspondía aproximadamente a la dilución de 1:2 x 10⁻⁸. En cuanto a la acción protectora de las vacunas, desarrollóse otra vez en ambos productos, por cierto con la misma desigualdad:

mayor protección por parte de la vacuna venezolana y menor por parte de la colombiana. Los animales tratados con la primera soportaron 2.017.000 M.L.D., mientras que los con la segunda no pasaron de 1.268 M.L.D.

Comparando ahora la inmunidad lograda en el cuadro anterior con la del presente (cuadro N^o 2), esta última aparenta ser más alta, aunque la vacunación fue efectuada en la misma forma y con los mismos productos. Sospéchase, según lo prueba el ensayo N^o 2, que ello no es debido a la diferencia inmunológica entre los virus aquí empleados, sino más bien a la desigualdad de sus respectivos títulos. En efecto, mientras el del cuadro N^o 1 alcanzó sólo la dilución de 1:100.000, el del cuadro N^o 2 ha sido más de 2.000 veces mayor (1:201.700.000).

Resumiendo el experimento que antecede, puede asentarse: que entre los dos virus encefalomiélicos equinos aquí estudiados —el de Colombia y el de Venezuela—, comprobóse la existencia de la inmunidad cruzada. Por otra parte, el virus de Venezuela, o, mejor dicho, la vacuna preparada con él, superó antigénicamente el de Colombia. Además, parece que el número de M.L.D. que soportan los animales inmunizados es mayor, cuando las inoculaciones de prueba son hechas con virus de título alto.

Ensayo N^o 2

En el experimento acabado de exponer, llamó la atención la pobreza antigénica demostrada por la vacuna con virus de Colombia al lado de la otra, a pesar de que al elaborarse los dos productos la concentración del virus en las respectivas papillas embrionales ha sido más o menos igual (10⁻⁶). Además, se expuso la sospecha de que el número de M.L.D. soportado por animales inmunizados con una misma vacuna puede variar según la al-

tura del título del virus utilizado en las inoculaciones de prueba.

Para aclarar estos puntos, se organizó el experimento que a continuación se expone: en síntesis, representa la repetición de la primera fase del ensayo N° 1 (cuadro N° 1), utilizando en la inmunización de animales las mismas vacunas y técnicas de aquél. Tan sólo que las inoculaciones de prueba se realizaron con cerebro encefalomielítico de título más alto (1:4239.-000). Los resultados que se obtuvieron los revela el cuadro N° 3.

Otra vez las dos vacunas protegieron contra el virus de Colombia, al par que volvió a comprobarse la ya citada superioridad antigénica de la vacuna venezolana sobre la elaborada con el agente colombiano. En efecto, mientras que esta última protegió a los animales sólo contra 4.239 M.L.D. del virus homólogo, la preparada con virus de Venezuela confirió protección contra 302.785 M.L.D. del mismo virus.

Apreciando ahora el grado de protección lograda por las dos vacunas del ensayo en conjunto, indudablemente es mayor que la observada en el cuadro N° 1, cuando el virus empleado tuvo título relativamente bajo.

Sintetizando el ensayo N° 2, puede decirse: que de nuevo se comprobó la similitud inmunológica entre los virus encefalomielíticos de Venezuela y de Colombia, al igual que la superioridad inmunizante de la vacuna elaborada con el primero de los virus. Además, hay indicios de que mientras mayor es el título del virus encefalomielítico usado en las inoculaciones de prueba, mayor es el número de M.L.D. que de él soportan los animales inmunizados.

DISCUSION

De los ensayos de inmunidad cruzada antes expuestos se des-

prende que los dos virus encefalomielíticos equinos, el de Colombia por un lado y el de Venezuela por otro, pueden considerarse inmunológicamente como idénticos. A la vez, es de esperar que así como el virus de Venezuela, también el agente colombiano será antigénicamente distinto de los demás virus encefalomielíticos del continente (Este, Oeste y argentino).

Merece atención sólo el hecho de que el virus colombiano no se prestó para la elaboración de una vacuna preventiva tan potente como la que se logró con el virus encefalomielítico de Venezuela. La superioridad de esta última fue en una ocasión casi 30 veces mayor (cuadro N° 1) y en otra 71 veces (cuadro N° 3).

Debido a que la elaboración de las dos vacunas se llevó a cabo en condiciones de absoluta igualdad, inclusive el número de los embriones utilizados (150 para cada vacuna) y el título del virus en las papiilas embrionales respectivas (10-6), es de sospechar que la diferencia notada entre los dos productos esté relacionada con la naturaleza intrínseca, respectivamente capacitada antigénica, de los dos virus. Esto es tanto más probable que el virus venezolano es una cepa que desde el año 1938 ha sufrido en nuestros laboratorios centenares de pases consecutivos a través de animales de experimentación, mientras que el virus colombiano es una cepa relativamente joven. La existencia de un fenómeno similar entre otros virus, por ejemplo rábicos, es más conocida (virus de calle-virus fijo).

No obstante, por otra parte, no es del todo imposible que la alta capacidad antigénica del virus encefalomielítico de Venezuela sea su propiedad *sui generis*, no adquirida. Por lo menos así lo sugieren nuestras observaciones anteriores, según las cuales otra cepa ence-

falomiéltica equina recién aislada en el campo y aprovechada para la elaboración de un lote de vacuna embrional, logró proteger a los ratones hasta contra 100.000 de M.L.D.

Otro fenómeno que amerita discusión es el por qué de la desigualdad en la protección de la vacuna anti-encefalomiéltica cuando se la prueba enfrente de un mismo virus, pero de distinto título. En efecto, se ha visto que mientras mayor es este último, mayor es el número de M.L.D. que los animales vacunados soportan. Aunque los presentes ensayos no permiten hacer conclusiones definitivas al respecto, es posible sospechar que el fenómeno tenga alguna relación con la naturaleza del "inóculum", que por cierto en nuestros casos no ha sido virus puro, sino virus más suspensión cerebral. Mientras menor fue el título, se inoculó mayor cantidad de sustancia cerebral junto con un determinado número de M.L.D. del virus, y viceversa. Puede ser que estas sustancias orgánicas del cerebro protejan o favorezcan de alguna manera la acción del virus, el cual, una vez privado de ellas (inoculación de suspensiones cerebrales muy diluídas), es neutralizado por los anticuerpos del organismo inmunizado con relativamente mayor facilidad.

RESUMEN

Los primeros datos sobre la encefalomiéltis infecciosa de los equinos en Colombia son del año de 1935 (Albornoz). No obstante, el correspondiente virus logró aislarse sólo en 1941 (Soriano Lleras y Figueroa). En cuanto a Venezuela, allí la enfermedad irrumpió por primera vez en el año de 1936, lográndose el aislamiento del correspondiente agente infeccioso en el año de 1938 (Kubes y Ríos).

Los caracteres inmunológicos del virus de Venezuela han sido estu-

diados por varios autores (Kubes-Ríos, Beck-Wyckoff, Kubes Diamante, etc.), llegando a clasificarse como virus *sui generis*, distinto del virus Este, del Oeste y del argentino.

En cuanto a la naturaleza inmunológica del virus encefalomiéltico de Colombia, particularmente en lo que se refiere a su relación con el virus encefalomiéltico de Venezuela, hasta la fecha no se ha estudiado. Y precisamente al esclarecimiento de este tema tiene a contribuir el presente trabajo.

Los resultados pueden resumirse en la siguiente forma:

1º Ratones inmunizados con la vacuna anti-encefalomiéltica elaborada con virus de Colombia soportaron indemne, al igual que virus homólogo, numerosas M.L.D. del virus venezolano. Viceversa, ratones inmunizados con la vacuna anti-encefalomiéltica elaborada con virus de Venezuela, soportaron masivas cantidades de M.L.D. de cualquiera de los dos virus. De aquí se deduce la identidad inmunológica de los dos virus.

2º No obstante, el poder antigénico de la vacuna elaborada con virus de Venezuela demostró ser altamente superior al de la otra, ya sea empleada contra el virus no homólogo de Colombia o contra el homólogo de Venezuela. Supónese que ello sea debido a la mayor capacidad antigénica de la cepa venezolana; característica natural o adquirida en el laboratorio.

3º Hay indicios de que el número de M.L.D. que resisten los animales inmunizados por una misma anti-encefalomiéltica puede variar según la altura del título del virus empleado en las inoculaciones de prueba; mientras mayor es éste, mayor es el número de M.L.D. soportado.

CUADRO N° 1

INMUNIZACION	INOCULACION DE PRUEBA	NUMERO DE RATONES MUERTOS												NUMERO DE M. L. D. SOPORTADO
		NUMERO DE RATONES INOCULADOS												
		DILUCION												
15/10/42-22/10/42	3/11/42	-1 10	-2 10	-3 10	-4 10	-5 10	-6 10	-8 10	-10 10	-12 10				
Vacuna con virus Colombia. 3 inyecciones subcutáneas de a 0.2 c.c.	0.02 c.c. intracranalmente de Colombia Virus encefalomielítico equino	6/6	4/6	3/6	3/6	0/6	0/6	0/6	-	-	-	-	71	
Vacuna con virus Venezuela. 3 inyecciones subcutáneas de a 0.2 c.c.		4/6	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	-	-	-	-	2.127	
Controles		-	6/6	-	6/6	-	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	Dilución = 1 M.L.D. 1:100.000	

CUADRO N° 2

INMUNIZACION	INOCULACION DE PRUEBA	NUMERO DE RATONES MUERTOS												NUMERO DE M. L. D. SOPORTADO
		NUMERO DE RATONES INOCULADOS												
		DILUCION												
15/10/42-22/10/42	3/11/42	-1 10	-2 10	-3 10	-4 10	-5 10	-6 10	-8 10	-10 10	-12 10				
Vacuna con virus Colombia.	Virus encefalomielítico equino de Venezuela 0.02 c.c. intracranalmente	6/6	5/6	6/6	4/6	5/6	1/6	-	-	-	-	-	1.268	
3 inyecciones subcutáneas de a 0.2 c.c.														
Vacuna con virus Venezuela.		4/6	2/6	0/6	1/6	3/5	0/6	-	-	-	-	-	2.017.000	
3 inyecciones subcutáneas de a 0.2 c.c.														
Controles		-	6/6	-	6/6	-	6/6	3/6	1/6	0/6			Dilución = 1 M.L.D. 1.201.700.000	

CUADRO N° 3

INMUNIZACION	INOCULACION DE PRUEBA	NUMERO DE RATONES MUERTOS												NUMERO DE M. L. D. SOPORTADO	
		NUMERO DE RATONES INOCULADOS													
		DILUCION													
13/11/42-19/11/42	1/12/42	-1 10	-2 10	-3 10	-4 10	-5 10	-6 10	-7 10	-8 10	-10 10					
Vacuna con virus Colombia.	Virus encetalomifitico equino de Colombia 0.02 c.c. intracranalmente	5/6	2/6	3/6	3/6	2/6	0/6	0/6	-	-	-	-	-	4.239	
3 inyecciones subcutaneas de a 0.2 c.c.															
Vacuna con virus Venezuela.		3/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	-	-	-	-	-	302.785	
3 inyecciones subcutaneas de a 0.2 c.c.															
Controles		-	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	2/6	0/6	0/6				Dilución = 1 M.L.D. 1:4.239.000	

REFERENCIAS

- 1) Albornoz, J. E. (1935): La peste loca de las bestias (enfermedad de Bor-na). Suplemento al Boletín de Agricultura N° 26; 1-8. Public. del Ministerio de Agricultura y Comercio, Bogotá.
- 2) Kubes, V. (1936): La peste loca de las bestias. Sus manifestaciones, tratamiento y prevención. Public. del Ministerio de Agricultura y Cría, Caracas.
- 3) Kubes, V., y Ríos, F. (1939): Infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. Advance data concerning the causative agent. Canadian Journal of Comparative Medicine, 3, N° 2: 43-44.
- 4) Kubes, V., y Diamante A. (1942): Estudios de inmunidad cruzada entre el virus de la encefalomiélitis equina de Venezuela y los virus encefalomielíticos norteamericanos Este y Oeste y el argentino. Bol. del Instituto de Investigaciones Veterinarias, Caracas, N° 2: 49-79.
- 5) Ministerio de Agricultura y Comercio (1936): Comunicados oficiales sobre la peste loca de las bestias publicados en "El Tiempo" de Bogotá, mes de octubre.
- 6) Reed, L. J., y Muench, H. (1938): A simple method of estimating fifty per cent endpoints. American Journal of Hygiene, 27, N° 3: 493-497.
- 7) Soriano Lleras, A., y Figueroa, L. (1942): Aislamiento de un virus de caballo atacado de "peste loca" en Bogotá. Bol. del Inst. Nac. de Hig. Samper Martínez, N° 8: 1-15, Bogotá.