

TÍTULOS DE ANTICUERPOS POSTVACUNALES EN ÉQUIDOS INMUNIZADOS CON LA CEPA TC-83 DEL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA

Post- vaccination antibody titles in equines vaccinated with TC83 strain of the Venezuelan equine encephalitis virus

Nereida Valero^{1,6}, Julia Arias², Mario Pérez^{3,6}, Alberto Medina³, Eliseo Rodríguez^{4,6}, María Nardone^{5,6}

¹Sección de Virología, Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette". Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Apartado 1151, Maracaibo, Venezuela. E-mail: nere98@hotmail.com. ²Departamento de Microbiología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. ³Departamento de Enfermedades Transmisibles. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. ⁴Dirección de Saneamiento Ambiental y Contraloría Sanitaria del Estado Zulia. Ministerio de Salud. ⁵Dirección Regional de Epidemiología. Estado Zulia. Ministerio de Salud. ⁶Comité Regional de Vigilancia de EEV y otras arbovirosis

RESUMEN

A raíz de la última epidemia de Encefalitis Equina Venezolana (EEV) ocurrida en Venezuela en 1995, que afectó a équidos y humanos del estado Zulia y otras entidades del país, se implementó el reforzamiento de los programas de vigilancia epidemiológica para la prevención y control de las encefalitis equinas. Se tomó como medida eficaz la implementación de nuevos ciclos de inmunización sistemática de los équidos en las zonas de riesgo. Para evaluar la duración de la inmunidad proporcionada por la vacuna a base de virus atenuado, cepa TC-83, utilizada en el programa de inmunización, se analizaron 662 muestras séricas de équidos vacunados en diferentes períodos (194 con dos años después de vacunados, 412 con un año y 56 con seis meses), sin antecedentes de enfermedad y procedentes de diferentes Municipios del estado Zulia, Venezuela. Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) para determinar títulos de anticuerpos IgG anti-EEV. Se detectó 39,8% (164/412) de sueros positivos en los animales con un año de vacunación, de los cuales al 60,2% no se les detectaron títulos de anticuerpos. Así mismo, se detectó un 95,9% (186/194) de équidos con dos años de vacunación sin inmunidad anti-EEV. De los 56 équidos con 6 meses de vacunados, 48 (87,7%) mostraron altos títulos de anticuerpos. Los resultados evidencian una pérdida de la inmunidad anti-EEV relacionada con el tiempo post vacunal y una efectiva respuesta en los équidos con seis meses de inmunización, sugiriendo una pronta revisión del programa de

vacunación específicamente en cuanto a la evaluación del tiempo de duración de la actividad antigénica y/o posibles fallas en la aplicación de la misma.

Palabras clave: Encefalitis equina venezolana, inmunidad, vacuna, équidos.

ABSTRACT

As a result of the last Venezuelan equine encephalitis epizootic (VEE), happened in Venezuela during 1995 that affected equidae and humans of Zulia State and another states of the country, the reinforcement of epidemiological surveillance programs for the prevention and control of equine encephalitis was established. As an efficient measure, the new cycles implementation of systematic equine immunization in the risk areas was taken. In order to evaluate the duration of the immunity with a TC-83 strain attenuated virus vaccine, used in the vaccination program, 662 equidae sera samples, vaccinated at different times (194 with two years, 412 with a year and 56 with 6 months postvaccinated) without disease precedents and from different municipalities of Zulia State, Venezuela, were analyzed through an immune enzymatic assay (ELISA) to determine IgG anti VEE antibodies titles. A 39.8% (164/412) of positive sera in one year postvaccinated animals was detected, from which 60.2% do not showed antibodies titles. Furthermore, a 95.9% (186/194) equidae with two years postvaccinated without immunity to anti-VEE were detected. From the 56 equidae with 6 months postvaccinated, 48 (87.7%) showed high antibodies titles. The results demon-

strated a lack of anti-VEE immunity, suggesting a prompt revision of the vaccination program specifically related to the evaluation of the antigenic's activity length time and/or possible faults in its application.

Key words: Venezuela equine encephalitis, immunity, vaccine, equidae.

INTRODUCCIÓN

El virus de la encefalitis equina venezolana (EEV) desde su aislamiento en Venezuela, por Kubes y Ríos en 1938 [6], ha causado gran número de casos y muertes en équidos y humanos.

La gravedad de la epidemia registrada en los últimos años de la década de los 60, iniciada en Ecuador, América del Sur, que afectó a América Central y América del Norte, impulsó a los representantes de los Estados miembros de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), a aprobar la creación de un servicio para la vigilancia epidemiológica de la EEV [11].

Entre los años 1973 y 1974 se vacunaron un total de 4.000 équidos en los municipios Mara, Páez, Maracaibo, Rosario de Perijá, Sucre y Miranda del estado Zulia, Venezuela y se cree que esta vacunación evitó la aparición de nuevos casos, además de proteger indirectamente a la población humana [15]. El desarrollo de inmunidad anti EEV después de la vacunación con la cepa TC-83, fue demostrada en diversos trabajos de campo y experimentales realizados en diferentes regiones de América [1,5,17,19]. Ryder y col. [16], en 1978, demostraron un 81,0 % de positividad en una población de équidos después de seis semanas de vacunados con la misma.

Los brotes epidémicos de EEV después de la penúltima presentación en 1973, permanecieron silentes durante un periodo de 18 años. Esta ausencia de circulación del virus conllevó a la declinación de la vigilancia epidemiológica de las encefalitis equinas en los países de la región de las Américas, incluyendo Venezuela [10], lo cual condujo al abandono parcial de los programas de vacunación y por ende, la presencia de équidos susceptibles.

En 1992-1993, se registraron brotes epizooticos de EEV en los estados Trujillo y Zulia, en una población de équidos susceptibles, donde se iniciaron campañas de vacunación en diferentes Estados occidentales del país. Sin embargo, debido a la discontinuidad de los programas de vigilancia, sumado a ciertas condiciones ambientales y ecológicas, se presentó una nueva epidemia en 1995, que afectó siete Estados del país: Zulia, Falcón, Lara, Yaracuy, Carabobo, Cojedes y Guárico causando la enfermedad en más de 40.000 personas, con 46 defunciones y la muerte de 600 équidos [2,10,11].

A raíz de esta última epizootemia ocurrida en 1995 se evidenció la necesidad de implementar programas de vigilancia epidemiológica más eficaces. Una de las medidas de control más práctica y eficaz en las zonas de riesgo, consiste en la vacunación de los équidos y el control de vectores, sin dejar

de mencionar la ubicación de comunidades susceptibles y el monitoreo continuo de la actividad viral en animales centinela, humanos y équidos [11,12,13].

El programa que ha venido implementando la Dirección del Servicio Autónomo y Sanidad Agropecuaria del estado Zulia (SASA-Zulia), refiere como porcentajes de cobertura de vacunación para el año 2002, 13,6% en los municipios Mara y Almirante Padilla, 83,4% en Páez y 80,6% en Miranda. Valero y col. [18], demostraron un bajo grado de inmunidad (38,6%) al virus EEV en una población de équidos de diferentes Municipios del estado Zulia, sugiriendo posibles fallas en la cobertura de vacunación que contempla la viabilidad de las vacunas utilizadas.

La vigilancia de los casos equinos en las áreas con poblaciones de équidos susceptibles permite obtener información práctica y sensible en reconocer el riesgo para la salud pública, sobre todo en aquellas zonas donde no existe registro de la actividad del virus en animales silvestres o mosquitos. La notificación de síndromes compatibles con encefalomielitis en equinos debe generar la investigación de cada caso que se presenta, teniendo en cuenta que la vigilancia activa abarca la notificación de casos en équidos sospechosos y la recolección de muestras de sangre para confirmar el diagnóstico en el laboratorio. Así mismo, se aconseja continuar evaluando el riesgo de epizootias de EEV u otras encefalitis existentes por medio de encuestas seroepidemiológicas que determinen el estado inmunitario de la población equina, sin desconocer la probabilidad de que ocurran nuevos brotes a medida que los animales inmunes son reemplazados por susceptibles [11]. En este sentido, García y col. [2], determinaron dentro de las fallas del sistema de vigilancia epidemiológica de la EEV, la falta de muestreos serológicos pre y post vacunación de équidos en algunos Estados del país, cuya ejecución aportaría información sobre la duración de la inmunidad con lo cual se pueden establecer los periodos de revacunación.

Estos programas de vacunación, implementados en los últimos años no han sido evaluados en cuanto a la eficacia post-vacunal se refiere, solo se ha determinado la actividad viral con la colocación de animales centinelas en zonas de riesgo y el seguimiento de casos febriles en humanos. Por esta razón en el presente trabajo se planteó evaluar la efectividad de la vacuna TC-83 a virus vivo atenuado para el virus de la EEV en una población de équidos de diferentes Municipios del estado Zulia, cuantificando los títulos de anticuerpos IgG en el suero de los mismos y correlacionarlos con el tiempo post vacunación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se estudiaron 662 muestras de sangre de équidos (equinos, burros y mulas) vacunados con la cepa TC-83 a virus vivo atenuado (Vecol, SA, Santa Fé de Bogotá, Colombia) y previa evaluación de su potencia por parte del organismo competente), provenientes de diferentes sectores de los municipios

Mara, Páez (áreas de alto riesgo para encefalitis equinas con vegetación de bosque húmedo tropical); Miranda (zona de alto riesgo con vegetación de bosque seco tropical); Almirante Padilla (región de mediano riesgo y con vegetación de bosque húmedo tropical) y Santa Rita (área de bajo riesgo con vegetación de bosque tropical) del estado Zulia. Del total de muestras procesadas, 56 sueros corresponden a équidos vacunados seis meses antes de la toma de muestra, 412 sueros de équidos vacunados un año antes y 194 dos años antes.

El tamaño de la muestra a analizar se calculó en base al número de équidos vacunados registrados en la zona entre los años 1999 y 2001, según SASA- Zulia, aplicando la fórmula: [21]

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{e^2}$$

donde:

- n= número de muestras.
- p= expectativa de probabilidad de detección de seropositividad (50%)
- q= (1-p) probabilidad de ausencia de seropositividad (50%)
- Z= coeficiente de confiabilidad.
- e²= error máximo admisible.

De esta manera se obtuvo el valor mínimo aceptable de muestras séricas de équidos vacunados.

Recolección de las muestras

La toma de muestras se realizó por punción de la vena yugular del animal y la sangre se recolectó en tubo al vacío sin anticoagulante para la obtención de los sueros, que fueron transportados a temperatura de congelación hasta la Sección de Virología del Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette" de la Universidad del Zulia (LUZ). Las muestras fueron almacenadas a -20°C, hasta su procesamiento. La recolección estuvo a cargo del personal de SASA-Zulia y de la Dirección de Contraloría Sanitaria y Salud Ambiental del Ministerio de Salud (MS). Se diseñó un instrumento que permitió recolectar información de cada animal sometido a estudio, el cual incluyó datos como: edad, sexo, especie, vacunaciones previas y tipo de vacuna aplicada. Así mismo, cada animal muestreado de manera aleatoria fue identificado por sus características fenotípicas y un número de historia.

Evaluación serológica

Los títulos de anticuerpos IgG séricos se determinaron mediante la técnica de Inmunoensayo enzimático de fase sólida (ELISA), descrita por Rosato y col. [14], utilizando como antígeno la cepa atenuada TC-83 de EEV, obtenida de cerebro de ratón lactante inoculado, a una dilución de 1:200, donado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades Infeccio-

sas de los Estados Unidos de América (CDC, Fort Collins, EUA), considerándose positivas las muestras cuya máxima dilución del suero era igual o mayor al de validación del ensayo.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las variables estudiadas (edad y tiempo de vacunación) fueron expresados en cifras porcentuales y analizados por la prueba Ji-cuadrado con el test exacto de Fisher, utilizando un criterio de significancia de P<0,05. El levantamiento de la información se realizó dentro del estudio del programa GraphPad, Versión 4,02 para Windows [4].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo de anticuerpos específicos e inmunidad contra el virus de la EEV después de la vacunación con la cepa TC-83, ha sido demostrado en diferentes trabajos de campo conducidos en Panamá y Costa Rica [3,20], Nicaragua [19] y Venezuela [16], así como también, en ensayos experimentales [19].

En el presente estudio, de las 662 muestras procesadas de équidos con antecedentes de vacunación, los anticuerpos Ig G anti-EEV fueron detectados sólo en 220 (33,2%) y 442 (66,8%) resultaron seronegativas (TABLA I). No se esperaban estos resultados, considerando que el 100% de los animales incluidos en la presente investigación presentaban antecedentes de vacunación, por lo que se esperaba un mayor grado de inmunidad. Sin embargo, estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por Medina y col. [8], quienes detectaron un 29,5% y 35,1% de negatividad a EEV en équidos vacunados con la cepa TC-83 en las parroquias Encontrados y Jesús María Semprun del municipio Catatumbo del estado Zulia, respectivamente. Este nulo desarrollo de anticuerpos en 442 muestras podría deberse a posibles fallas en la logística implementada en las campañas de vacunación, específicamente en los Municipios donde la actividad es netamente de campo y pueden perderse ciertas precauciones de mantenimiento y conservación de la vacuna como protección de luz, refrigeración a 4°C o pérdida de la cadena de frío y la no utilización rápida luego de su reconstitución, hechos que podrían explicar en parte la pérdida de su propiedad inmunogénica. McClain y col. [9] re-

TABLA I
DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE ANTICUERPOS
ANTI EEV DE UNA POBLACIÓN DE ÉQUIDOS
VACUNADOS CON LA CEPA TC- 83 /
PROPORTION OF ANTI VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALITIS
ANTIBODIES IN EQUINES VACCINATED WITH TC-83 STRAIN

anticuerpos IgG ANTI - EEV	n	%
Positivos	220	33,2
Negativos	442	66,8
Total	662	100,0

portaron la existencia de interferencia inmunológica que ocasionan los anticuerpos contra otros *alfavirus* como la encefalitis equina del este y del oeste, los cuales podrían estar circulando en forma conjunta, e interferir en el desarrollo de anticuerpos anti-EEV.

Del total de las muestras seropositivas, se evidencia una mayor inmunidad 87,7% (24 de 28 muestras) en los animales con 6 meses de vacunación con respecto a los que presentaban 12 meses (39,8%) y 24 meses (4,1%) ($P < 0,05$) de vacunados (FIG. 1) Estos resultados mantienen lo demostrado por Walton y col. [20] quienes observaron títulos elevados de anticuerpos neutralizantes en el suero de caballos al sexto mes post vacunación, los cuales disminuyeron progresivamente hasta después de un año. Así mismo, Ryder y col. [16] reportaron, al evaluar la respuesta de anticuerpos contra EEV en équidos con seis semanas después de la vacunación, un 81% de positividad. Estos datos evidencian la propiedad protectora e inmunogénica de la TC-83.

De los resultados obtenidos llama la atención el alto porcentaje de animales con 24 meses post vacunados sin anticuerpos 95,9% (186 de 194), lo que sugiere una disminución de la inmunidad a partir del año post vacunación, datos que difieren a los publicados por McKinney y col. [7], quienes describen una protección de la cepa TC-83 por más de dos años, con una sola aplicación. Este hecho resalta la importancia de realizar muestreos serológicos, pre y post vacunación, los cuales aportan información valiosa sobre la duración de la inmunidad lo cual contribuiría a reorientar los períodos de revacunación en las poblaciones de équidos, tal como lo reporta García y col. [2], al determinar las acciones y mecanismos de información del sistema de vigilancia epidemiológica de la EEV en los Estados de alto y mediano riesgo; evidenciando como limitante la no realización de encuestas serológicas antes y después de la vacunación de los équidos.

Los títulos de anticuerpos IgG anti EEV en la población de équidos vacunados incluidos en el estudio fueron relaciona-

dos con el tiempo de vacunación (TABLA II). Más del 50% de los animales con seis meses de vacunados, presentan títulos por encima de 1/1280. Esto demuestra una eficiente respuesta inmunitaria humoral de los animales a la vacuna empleada, quedando claro que la variación de los títulos depende en parte del receptor y en gran medida, de la capacidad antigénica de la vacuna, propiedad que puede ser diferente entre un lote y otro. Walton y col. [20] encontraron diferencias de títulos de anticuerpos neutralizantes en caballos inmunizados con dosis de vacuna TC-83 de un lote con respecto a otro, sugiriendo algunos cambios del virus en el transcurso de períodos de almacenamiento y usadas después de diferentes métodos de manipulación y liofilización.

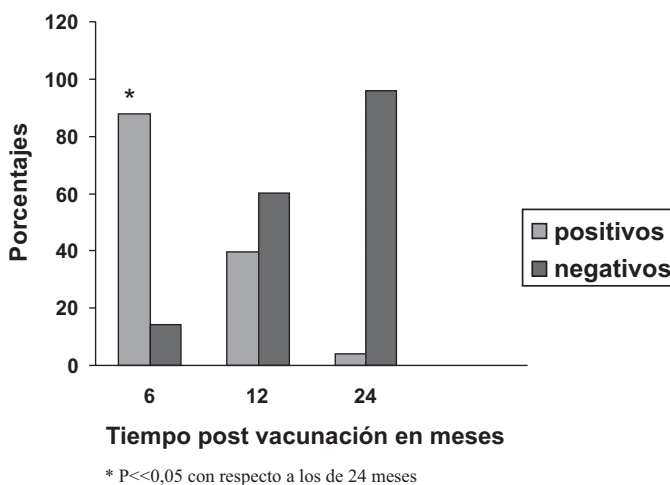


FIGURA 1. RESULTADOS SEROLÓGICOS RELACIONADOS CON EL TIEMPO DE VACUNACIÓN / SEROLOGICALS RESULTS RELATED WITH THE VACCINATION

TABLA II

TÍTULOS DE ANTICUERPOS ANTI EEV EN EQUIDOS INMUNIZADOS RELACIONADOS CON EL TIEMPO DE VACUNACIÓN / ANTIBODIES TITLES ANTI VEE IN IMMUNIZED EQUINES ACCORDING TO VACCINATION

Títulos de anticuerpos IgG anti-EEV	Tiempo de vacunación					
	6 Meses		1 Año		2 Años	
	n	%	n	%	n	%
1:40	0	0,0	2	2,4	0	0,0
1:80	0	0,0	60	36,6	0	0,0
1:160	4	8,3	28	17,1	6	75,0
1:320	4	8,3	30	18,3	2	25,0
1:640	6	12,5	28	17,1	0	0,0
1:1280	8	16,7	10	6,1	0	0,0
1:2560	4	8,3	4	2,4	0	0,0
1:5120	22	45,9	0	0,0	0	0,0
TOTAL	48	100,0	164	100,0	8	100,0

P: < 0,05.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se determinó un bajo nivel de inmunidad 39,8% y 4,1% en los animales con uno y dos años de vacunación, respectivamente; evidenciándose una pérdida de protección contra EEV relacionada con el tiempo post vacunal.

Se observó un mayor porcentaje de anticuerpos IgG anti EEV en los équidos que tenían seis meses de haber sido vacunados, sugiriendo esto una eficiente respuesta humoral por parte de los animales a la vacuna empleada.

La pérdida de la inmunidad evidencia la necesidad del monitoreo de anticuerpos en las poblaciones de équidos vacunados y de revacunados.

Se sugiere evaluar el programa en cuanto a tiempo de duración de la actividad antigénica o a posibles fallas en el procedimiento de la vacunación tales como pérdida de la cadena de frío, manipulación prolongada, entre otras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAKER, E.; SASSO, D.; MANESS, K.; PRICHARD, W.; PARKER, R. Venezuelan equine encephalomyelitis vaccine (strain TC-83): a field study. **Am J Vet Res.** 39 (10):1627-31. 1978.
- [2] GARCÍA, A.; MEDINA, A.; PÉREZ, M. Vigilancia epidemiológica de la Encefalitis Equina. Venezolana. **Rev Científ. FCV-LUZ.** XII (4): 296-303. 2002.
- [3] GERALD, E.; MARTIN, D.; REEVES, M.; JOHNSON, K. Field Studies of an attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis Vaccine (Strain TC-83). **Infect Immun.** 5(2): 160-163. 1972.
- [4] GRAPHPAD USER'S GUIDE. Versión 4,02 para Windows. San Diego California, USA: 2005.
- [5] JAHRING, P.; STEPHENSON, E. Protective Efficacies of live attenuated and formaldehyde inactivated Venezuelan equine Encephalitis virus vaccines against aerosol challenge in hamsters. **J Clin Microbiol.** 19 (3): 429-431. 1984.
- [6] KUBES, V.; RIOS, F. The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. **Science.** 90: 20-21. 1939.
- [7] MCKINNEY, R.; GERGE, T.; SAWGER, W. Use of a attenuated strain of Venezuelan equine Encephalomyelitis virus for immunization in mem. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 12: 597-603. 1963.
- [8] MEDINA, G.; SALAS, R.; DE SIGER, J.; JAIME, E.; MORALES, G.; MATHEUS, I. Virus de Encefalitis equina Venezolana en el municipio Catatumbo del Estado Zulia 1995-1996. Distribución y comportamiento. **Vet Trop.** 25 (1): 41-61. 2000.
- [9] McCLAIN, D.J.; PITTMAN, P.R.; RAMSBURG, H.H.; NELSON, G.O.; ROSSI C.A.; MANGIAFICO, J.A.; SCHMALJOHN, A.L.; MALINOSKI, F. Immunologic interference from sequential administration of live attenuated alphavirus vaccines. **J. Infect. Dis.** 177: 634-641.1998.
- [10] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Brote de Encefalitis Equina Venezolana, 1995. **Bol Epidemiol.** 16(4): 1-10. 1995.
- [11] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Sistema de información y vigilancia epidemiológica de la encefalitis equina venezolana en la región de las Américas. **Rev Panam Sal Públ.** 6(2): 128-138. 1999.
- [12] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD: **Seminario-Taller sobre la vigilancia de las Encefalitis Equina.** Maracaibo. Septiembre, 03. 18 pp. 1997.
- [13] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Programa de Cooperación Técnica entre países. Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Ministerio de Producción y Comercio. Instituto Colombiano Agropecuario. **I Reunión Binacional Colombo-Venezolana sobre Encefalitis Equina. Informe Técnico.** Maracaibo. Julio 27 y 28. 53 pp. 2000.
- [14] ROSATO, R.; MACASET, F.; JAHRING, P. Enzyme - linked immunoabsorbent assay. Detection of immunoglobulins G and M to Venezuelan equine encephalomyelitis virus in vaccinated and naturally infected humans. **J Clin Microbiol.** 26 (3): 421-425. 1988.
- [15] RUIZ-PADILLA, L.A. **Vacunación anti-Encefalitis Equina Venezolana con la vacuna a virus vivo modificado TC-83. 1973-1974.** Informe final presentado a la División de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Cría. Venezuela. 10 pp. 1975.
- [16] RYDER, S.; RUIZ-PADILLA, L.; BLITZ-DORFMAN, L.; SOTO, A. Respuesta de anticuerpos contra Encefalitis Equina Venezolana en équidos vacunados con la vacuna a virus vivo modificado (TC-83). **Invest Clín.** 19(3): 116-123. 1978.
- [17] SPERTZEL, R.; KAHN, D. Safety and efficacy of an attenuated Venezuelan equine encephalomyelitis vaccine for use in Equidae. **J Am Vet Med Ass** 159: 731-38. 1971.
- [18] VALERO, N.; LARREAL, Y.; ARIAS, J.; ESPINA, L.M.; MALDONADO, M.B.; MELEAN, E.; ESTEVEZ, J.; PÉREZ, M.; ÁVILA, J.; LUZARDO, M.; MOREL, P.; URDANETA, N. Seroprevalencia de la Encefalitis Equina Venezolana en una población de équidos del estado Zulia, Venezuela, 1999-2001. **Rev Científ. FCV-LUZ.** XIV (4): 324-330. 2004.
- [19] WALTON, T.; BRAUTIGAM, F.; FERRER, J.; JOHNSON, K. Epizootic Venezuelan equine encephalomyelitis

- in Central America. Disease pattern and vaccine evaluation in Nicaragua, 1969-1970. **Am J Epidemiol.** 95(3):247-54. 1972.
- [20] WALTON, T.; ALVAREZ, O.; BUCKWALTER, R.; JOHNSON, K. Experimental Infection of Horses with an Attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis vaccine (Strain TC-83). **Infect Immun.** 5(5):750-756. 1972.
- [21] WAYNE, W.D. **Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud.** 3ra Ed. Uteha Noriega Editores. México. 137 – 170pp. 1993.