-

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo Final realizado como requisito para optar al título de
ESPECIALISTA EN DIAGNÓSTICO VETERINARIO DE LABORATORIO

Evaluación de títulos de anticuerpos en equinos contra la cepa 2001 de Influenza equina mediante la prueba inhibición de la hemoaglutinación.

Autor: Rodríguez Ariadna

Director: Alejandra Larsen

Codirector: Mercedes Abeyá

Lugar de trabajo: **Laboratorio de la Cátedra de Virología (LAVIR)- FCV-UNLP**

Año 2022

INDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS…….....3
RESUMEN.....4
1.INTRODUCCION.....5
1.1. Características generales de la familia viral y antecedentes de la enfermedad ..5
1.2. Virus de la influenza equina…….....10
1.2.1. Taxonomía y características de la familia viral…….……10
1.2.2 Morfología viral…….…….……...…….……..12
1.2.3 Transmisión ……..……..……14
1.2.4 Patogenia viral ……....15
1.2.5 Respuesta inmune …….…17
1.3 DIAGNOSTICO ……18
1.3 .1 Pruebas directas…….…18
1.3.2 Pruebas indirectas……..……..19
1.4. CONTROL Y VACUNA…….…….20
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIOS ……...……24
2.1 Objetivo general…….…….…….24
2.2 Objetivos especificos……...……...…….24
3. HIPOTESIS …….……..24
4. MATERIALES Y METODOS …….……24
4.1 Titulación viral por hemoaglutinación…….....……..……24
4.2 Test de hemoaglutinación……..……25
4.3 Inhibición de la hemoaglutinación ……..…….……..27
4.4 Analisis estadistico ……..……..……..28
5.RESULTADOS ……..……...…..28
6. DISCUSION Y CONCLUCION……34
7. BIBLIOGRAFIA ……42
ANEXO I ……37
ANEXO II ……40

ABREVIATURAS

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

CABA Ciudad Autónoma Buenos Aires

PBI Producto Bruto Interno

UBA Universidad de Buenos Aires

TN toneladas

IE Influenza Equina

EIV Virus de Influenza Equina

ICTV Comité Internacional de Taxonomía Viral

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido Ribonucleico

ARNm ARN Mensajero

HA Hemaglutinina

NA Neuraminidasa

NP Nucleoproteína

NS1 Proteína no estructural

M1 Proteína matriz

M2 Proteína canal iónico

NS2 Proteína no estructural 2

PB1, PB2, PA Complejo polimerasas

nt Nucleótidos

SDS Dodecil sulfato sódico

RNPs Ribonucleoproteínas

OMSA Organización Mundial de la Salud Argentina

RESUMEN

Título de anticuerpos en equinos, contra la cepa 2001 de Influenza equina, mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

El virus de la influenza equina (EIV) es un patógeno común que afecta a caballos en todo el mundo, es altamente contagioso y causa una enfermedad respiratoria aguda que predispone al hospedador a infecciones bacterianas secundarias, como consecuencia puede producirse fibrosis pulmonar irreversible con la consiguiente merma en el rendimiento deportivo. Hasta el momento, este virus no se ha podido controlar satisfactoriamente a pesar del protocolo de vacunación determinado por SENASA y continúa siendo una seria amenaza para el bienestar de los caballos y un grave problema económico para la industria equina.

El objetivo del presente trabajo fue titular anticuerpos específicos contra la cepa A/Eq/La Plata 2001 aislada en el laboratorio de virología (LAVIR) de la Facultad de Ciencias Veterinarias- UNLP durante el brote de 2001. Se analizaron animales vacunados según protocolo y animales sin vacunación. Mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación se determinó que, a pesar de no hallarse diferencias significativas entre equinos vacunados y no vacunados, para las diferentes categorías (protegidos, parcialmente protegidos y no protegidos), en el grupo de protegidos los equinos vacunados presentaron mayor número de individuos con títulos mayor o igual a 1/256, respecto de los protegidos no vacunados. Estos resultados reafirman la importancia de mantener la vigilancia epidemiológica, tener en cuenta las variables halladas para su aplicación en la actualización de la formulación de las vacunas comerciales y cumplir con el protocolo de vacunación propuesto por la autoridad sanitaria. Este conjunto de medidas de manejo son las apropiadas para obtener una

respuesta inmune específica protectora y para mantener una inmunidad de rebaño con el objetivo de evitar futuros brotes como el ocurrido en el 2018.

1. **INTRODUCCIÓN**

1.1 Características generales del virus de influenza equina y antecedentes de la enfermedad

La Influenza equina, mejor conocida como gripe, está causada por un virus perteneciente al género Influenzavirus de la familia *Orthomyxoviridae*, compuesta por nueve géneros: *Alphainfluenzavirus, Betainfluenzavirus, Deltainfluenzavirus, Gammainfluenzavirus, Isavirus, Mykissvirus, Quaranjavirus, Sardinovirus, Thogotovirus* (Sguazza y Bravi, 2019).

La gripe equina o (IE) es una infección respiratoria aguda de los caballos, burros y mulas, causada por dos distintos subtipos virales de la influenza A (H7N7, anteriormente equi-1, y H3N8, anteriormente equi-2). El EIV fue aislado en Checoslovaquia por primera vez en 1956, durante una epizootia que abarcó Europa del Este y Suecia por lo que fue denominado A/1/Praga. Según Howard (1971) el segundo subtipo fue aislado en Miami, Florida, a partir de un brote de enfermedad respiratoria iniciado en febrero de 1963 en equinos imortados desde Argentina por vía aérea (Berríos y Col.,1992) extendiéndose hasta junio del mismo año al resto de los Estados Unidos, y a este subtipo 2 se lo denominó A/2/Miami. En los últimos años, la infección se ha introducido en Australia y Japón: y según se informa a la fecha, Nueva Zelanda e Islandia están libres de virus influenza equina (SENASA, 2022).

La diseminación del EIV en el continente americano ha seguido una ruta que se puede trazar, tentativamente, de acuerdo con la información epidemiológica disponible, iniciándose en USA en 1957 y el invierno de 1963, para extenderse sucesivamente a Canadá (1963), México (1966), Brasil (1963, 1969, 1977, 1985 y 2018), Uruguay (1963, 1977 y 1985), afectando a Chile en 1963, 1977, 1985 y 1992 (Berríos, 1995). Un aislamiento descrito en Sud América corresponde al subtipo H3 N8 realizado en Brasil en 2001. En Argentina el EIV se ha aislado en 1976 (H7N7), 1985-86 (H3N8) y 1993 (H3N8). Este último brote, en marzo de 1993 en la República Argentina se produjo en los Hipódromos de Palermo y San Isidro (Berríos y Celedón, 1992). En la tabla n°1 se detallan los brotes de la última década (Oladunni y col., 2021)
En octubre de 1994 ocurrió otro brote de menor intensidad, afectando a los animales de dos años de edad y al año siguiente se volvió a notificar otro episodio en el Hipódromo de San Isidro. En el período comprendido entre 2011-2016, en el Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) se notificaron 19 casos sospechosos de EIV con 12 eventos confirmados de la enfermedad y 238 equinos afectados (Olguin Perglione y col, 2016).

En la tabla 1 se detallan los brotes de la última década (Oladunni y Col., 2021), y como se observa en Argentina el último brote de EIV fue en el año 2018. Este brote se originó en Mendoza, más precisamente en una caballeriza cuyos animales se utilizaban para un recorrido de travesía andina en la que participaban caballos de excursión de Chile y de Argentina. Luego la enfermedad se confirmó en hipódromos, clubes de polo y clubes de salto ecuestre (https://bulletin.woah.org/?officiel=08-4-1-2019-2-panel-es-2&lang=es). acceso 21 de marzo 2021).

Tabla n°1: Brotes del EIV en la última década

PAÍS	**AÑO**	**NÚMERO DE ANIMALES**	**ANIMAL INFECTADO**
China	2010/11	-	Equino
Mongolia	2010/11	-	Equino
Argelia	2011	900	Equino
Argentina	2012	-	Equino
Brasil	2012	-	Equino
Chile	2012	-	Equino
China	2012	-	Equino
Kazajstan	2012	-	Equino
Uruguay	2012	-	Equino
Irlanda	2014	118	Equino
Malasia	2015	25	Equino
Brasil	2015	23	Equino
China	2017	-	Burro
Uruguay	2018	-	Equino
Chile	2018	-	Equino
Argentina	2018	-	Equino
Senegal	2019	-	Equino y burro
Reino Unido	2019	-	Equino
China	2020	-	Burro

Modificada de Oladunni y col. 2021.

El equino (*Equus caballus*) es una de las especies animales domesticadas más antiguas; junto al hombre y otras especies, ha evolucionado y cambiado su función y conformación a lo largo de la historia de la humanidad. Hoy representa una industria

que según Regúnaga (2006) se la puede definir como un sistema que presenta dos subsistemas: - 1) el subsistema equino argentino del caballo de andar deportivo y -2) el subsistema destinado a carne. En la actualidad, el subsistema de caballos deportivos en la Argentina es definido como una actividad netamente agropecuaria y suele autodenominarse como la industria hípica, comprende a todas las actividades económicas, productivas, comerciales y de esparcimiento relacionadas directa o indirectamente con el equino. Este subsistema es el que provee la materia prima para el segundo subsistema destinado a carne. En este sentido el subsistema carne debería ser una tercera dimensión dependiente del primero, ya que no existe la explotación equina que incluya engorde para faena. Por cuestiones culturales el mercado interno para el consumo no existe y todo lo producido se comercializa en el mercado internacional. No obstante, la Argentina es el principal exportador mundial de carne equina, posición que ostentó por más de 2 décadas y solo superado en estos años por Mongolia. En el país se faenaban aproximadamente 30.000 TN de carne de promedio, lo que representó para Argentina un ingreso de 100 millones de dólares durante el año 2009 y a pesar del subregistro de animales faenados, continúa siendo una actividad económica poco monitoreada que produce ganancias extraordinarias para los grupos frigoríficos (Eduardo E. Barbero, 2016). El consumo de carne equina en el mundo está centrado en los países de Europa, donde es considerada un producto de calidad y hay carnicerías especializadas en carne equina. Fuera de Europa, Japón es un mercado que cada vez más demanda este tipo de carne. Hoy en día en nuestro país, por una cuestión cultural y la afinidad que se les tiene a los caballos no se consume su carne, no obstante, existe consumos particulares en zonas rurales (Zorroaquín y col., 2005).

En la actualidad, a pesar de que el caballo sigue siendo un animal de trabajo y aunque muchas ONG están proponiendo el derecho de los animales a no ser explotados, en contexto de pandemia de la COVID-19, los equinos tuvieron un rol muy importante como dadores de sueros hiperinmunes como posible tratamiento, de todos modos su utilización en este rol continúa desde hace más de un siglo, como dadores de sueros para humanos (anti venenos de serpientes, arácnidos y alacranes) y animales (suero antitetánico) (Izcovich y col., 2021; Gil y col., 2009).

Independientemente de las nuevas miradas centradas en el bienestar animal, el caballo sigue teniendo una función fundamental en la economía de la Nación. A pesar que la industria hípica es estructuralmente deficitaria y está caracterizada por desequilibrios en todos sus niveles genera aproximadamente 81.700 puestos de trabajo, (lo cual no siempre son trabajos registrados), sostenidos principalmente

mediante apuestas, subvenciones del estado provincial y transferencias de tragamonedas, siendo su mayor concentración en Buenos Aires y CABA (Zorroaquín y col., 2005).

En Argentina, el stock de caballos en el año 2004 fue de 55.200.000 de animales. Según datos de la FAO (FAOStat, 2022): para el año 1961 en el mundo había 62.100.000 de cabezas, para el año 2004 la cantidad de caballos disminuyo en 6.900.000. En 2020 Argentina tuvo un stock de exportación de caballos deportivos de 2.600.000 de cabezas; quedando como tercer productor global de embriones equinos y el cuarto de animales de carrera. La actividad de la industria hípica representa el 8,7% del PBI agropecuario. Si bien todas las provincias argentinas tienen equinos, lo cierto es que solo cinco aglutinan el 56% del stock, Buenos Aires, Corrientes, Chaco, Entre Ríos y Córdoba, en ese orden suman 1.470.000 de cabezas, mientras que, en el extremo opuesto, la Ciudad de Buenos Aires y Tierra del Fuego no superan los 4.000 equinos (Eduardo E. Barberos, 2016).

Actualmente en nuestro país las funciones más importantes del equino son la de trabajo en tareas rurales, carga en áreas urbanas, deporte (carreras, polo, pato, salto, rodeo, equitación, enduro, raid, prueba de rienda) y espectáculos como la doma y las exposiciones. Las exportaciones de caballos vivos en el mundo, corresponden a caballos deportivos, comprenden animales ya entrenados, potros o animales para cría como pueden ser padrillos y yeguas, ya que son muy elegidos por su pedigree, su rendimiento y aptitud deportiva (Zorroaquín y col., 2005).

En el año 2003, se exportaron 312.000 cabezas lo que representó un valor de 1.951.000 US$ (tabla n°2). Como el equino es un animal netamente deportivo, tiene un valor agregado, dependiendo de la particularidad de cada animal. El principal exportador en el año 2003 fue EE.UU., en cambio Argentina totalizó una venta de 4.998 cabezas, representando 6.700.000 US$ (los datos de exportación para Argentina no coinciden con los datos de la secretaria de Agricultura Ganadería y Pesca (SAGPyA), la cual estima 2.326 caballos) .

Tabla n° 2: Exportaciones de caballos en el mundo
(en millones de U$S y cabezas/año 2003)

País	Mill. de US$	Cabezas	US$/cab
Mundial	1.360	312.266	4.355
EE.UU.	529	60.222	8.784
Reino Unido	503	8.310	60.529
Emiratos Árabes	141	615	229.268

Irlanda	134	4.568	29.335
Francia	93	14.970	6.212
Países Bajos	84,5	11.141	7.585
Alemania	77,6	4.869	15.938
Argentina (*)	6,7	4.998	1.314
Australia	76,1	3.727	20.419

Modificado a partir de (https://www.produccion-animal.com.ar)

Argentina es el país productor más importante de América del Sur y nuestros caballos son elegidos por su sanidad y calidad deportiva. Esta, es la principal motivación para fortalecer la importancia del estudio de la EIV, ya que, con frecuencia tanto en el turf como en el polo, equitación, domas, etc., la presencia de brotes está asociada al no cumplimiento del protocolo de vacunación propuesto por el SENASA. Las irregularidades respecto a la vacunación y su registro en la libreta sanitaria son incomprobables (no existe método diagnostico que permita detectar solo a los vacunados o solo a los infectados). Esta situación sumada a la mala prensa de las vacunas y su supuesta responsabilidad en la merma de la performance de los animales de deporte, los brotes en establecimientos relacionados a la actividad ecuestre y la experiencia de la practica veterinaria al momento de completar la libreta sanitaria o pasaporte, se acredita la falta de registro de la vacunación, la sumatoria de estos factores indicaría que los brotes de los últimos años tienen su causa en la disminución de la protección poblacional contra esta enfermedad, junto al descenso de la cobertura de anticuerpos vacunales individual (Zorroaquín y col., 2005).
El EIV constantemente sufre mutaciones que pueden evadir la protección vacunal, sumado al aumento del movimiento internacional de equinos de deporte, representa un alto riesgo para la instauración de brotes de la enfermedad con importantes pérdidas económicas y significa ademas una amenaza para la población humana y animal (Plata Hipólito, 2019)

El EIV es endémica en casi todo el mundo y provoca la salida de la actividad deportiva de gran número de equinos (Barber y Robin, 2008). En otras especies la gripe es una zoonosis muy importante, sin embargo, la gripe equina no es zoonótica pero sí ha sido detectada en perros (Crawford, 2005; Etchegaray, 2007). En 2005 se describió la transmisión interespecífica del EIV desde caballos infectados experimentalmente, a perros mantenidos en estrecho contacto (Yamanaka y col., 2009). No se ha demostrado que los humanos puedan contagiarse con el virus H3N8 de los perros,

aun así, se han descrito perros con el virus de la gripe humana H1N1 (Etchegaray, 2007).

1.2. Virus influenza equina

1.2.1. Taxonomía y características de la familia viral

Según el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) los *Orthomyxoviridae*, están compuestos por nueve géneros: *Alphainfluenzavirus, Betainfluenzavirus, Deltainfluenzavirus, Gammainfluenzavirus, Isavirus, Mykissvirus, Quaranjavirus, Sardinovirus, Thogotovirus*. Esta familia se caracteriza por tener un genoma segmentado formado por ARN de simple cadena con polaridad negativa y un complejo de ARN polimerasas encargadas de sintetizar los ARNm, sin mediar ningún estadio de ADN de su ciclo viral, lo que coloca a estos virus dentro del Grupo V de la clasificación Baltimore (Sguazza y Bravi, 2019).

Los integrantes del género Influenzavirus, poseen componentes antigénicos cuya identidad química y funcional los caracteriza. La característica más sobresaliente es que presentan el código genético dividido en ocho porciones de ARN, es muy inestable, lo que favorece los errores en la replicación con la aparición de mutaciones. Estas son mutaciones naturales cuyo objetivo es asegurar la supervivencia y productiva replicación de una de las formas de vida más antiguas (Grisolía, 2006). Otra característica importante son los componentes, uno de ellos es la nucleoproteína (NP), cuyas diferencias antigénicas permiten clasificarlos en los cuatro géneros ya citados (A, B, C Y D). Los virus de los géneros Influenzavirus B y C son patógenos predominantemente para los humanos, aunque también se aislaron de focas y cerdos respectivamente. Los virus del género C son genéticamente muy diferentes a los de los géneros A y B, sólo ocasionan infecciones respiratorias muy leves o incluso sin síntomas, no causan epidemias y no tienen gran impacto en la salud pública. Influenza D afecta principalmente al ganado, no se ha demostrado que pueda causar infecciones y/o enfermedad en los seres humanos. Los virus del género A presentan un espectro de hospedadores más amplio y se aislaron de diversas especies que incluyen: humanos, equinos, porcinos, mamíferos marinos, así como en aves domésticas y salvajes (Celedón, y col., 1993).

Los Influenzavirus del tipo A pueden ser divididos en diferentes subtipos de acuerdo a la composición de sus antígenos de superficie: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Hasta la fecha, se identificaron 18 subtipos de HA (denominados H1, H2, …, H18) y 11 subtipos de NA (N1, N2, …, N11). La mayoría de las combinaciones

posibles de estos subtipos se aislaron a partir de diferentes especies de aves, por lo tanto, se considera que las aves silvestres especialmente los patos, gansos y gaviotas, conforman el reservorio natural de estos virus y aunque por lo general no suelen ser patogénicos para sus hospedadores naturales, presentan alta morbilidad y mortalidad al ser transmitidos a otras especies (Acuña González, 2011).

El antígeno N8 ha presentado ligeras variaciones en las cepas Fontaineableau, Kentucky y Lexington, aunque mantiene las características básicas del subtipo. El subtipo H7N7 no ha presentado variaciones desde que se aisló por primera vez en Praga en 1956, es así que estudios filogenéticos basados en el análisis de la secuencia de nucleótidos revelan que este virus sería el linaje más antiguo de todos los virus de la influenza de mamíferos (OMSA, 2008).

Los virus del género Influenzavirus del tipo A son pleomórficos, envueltos y en su superficie presentan proyecciones. La partícula viral es muy sensible a solventes orgánicos capaces de degradar su envoltura (especialmente éteres y alcoholes), también lo es al tratamiento con detergentes no iónicos, formaldehido, agentes oxidantes, ácidos diluidos, dodecil sulfato sódico (SDS), sales derivadas de amonio cuaternario, etc. Su capacidad infectiva se reduce luego de su exposición al calor, radiaciones ionizantes, condiciones de pH extremo, medios no isotónicos y deshidratación. En condiciones de campo, el virus está protegido por las secreciones nasales y en algunos casos las heces, lo resguardan de la desecación y otros factores ambientales pudiendo mantener su capacidad infectiva por períodos de hasta 10 días (Timoney, 1996).

1.2.2. Morfología Viral

Como se comentó anteriormente, el EIV es pleomórfico, envuelto, tiene un diámetro de 80 a 120 nm y presentan simetría helicoidal. La partícula viral está constituida por la nucleocápside de naturaleza proteica, dentro de la que se encuentra el genoma viral, dispuestos en segmentos de ARN que se enumeran de acuerdo con su tamaño. Cada uno de los segmentos está recubierto por nucleoproteínas (NP), codificadas en el segmento 5, formando una combinación compleja de ribonucleoproteínas (RNPs) con estructura helicoidal que estabilizan y protegen al ARN genómico. Dentro de las RNPs se encuentran tres enzimas (PB2, PB1 y PA), codificadas por los segmentos 1, 2 y 3 respectivamente, que actúan en forma conjunta y tiene actividad de ARN polimerasa. La envoltura del virus está constituida por dos capas, una externa de naturaleza lipídica, derivada de la membrana citoplasmática de la célula hospedadora, que le confiere al virus su aspecto pleomórfico, y una capa interna, formada por una proteína

de origen viral codificada en el segmento 7, denominada proteína de matriz (M1) que provee estabilidad estructural y es el componente mayoritario de la estructura del virión (figura n° 1) (Muñoz y col.,1979).

En la superficie externa del virus, se encuentran dos tipos de peplómeros o espículas glicoproteícas antigénicas: hemaglutinina (HA) y neuranimidasa (NA). Estas glicoproteínas se encuentran codificadas en los segmentos 4 y 6 respectivamente. La mayoría de los segmentos del genoma viral codifican una única proteína con excepción de los 7 y 8 que pueden codificar dos proteínas, por splicing alternativo de los ARNm correspondientes. El segmento 7, codifica la M1 y una proteína integral de membrana denominada M2, presente en la superficie externa del virus, que actúa como canal iónico y es esencial para la replicación del virus *in vivo*. El segmento 8 codifica dos proteínas no estructurales: NS1 y NS2; ambas se encuentran abundantemente en las células infectadas (NS1 en el núcleo y NS2 en el citoplasma). Si bien NS1 no es incorporada dentro del virión durante el ensamblaje, NS2 puede aparecer en el virus en pequeñas cantidades. NS1 actúa principalmente como reguladora de la replicación y tiene la capacidad de bloquear la respuesta inmune mediada por el sistema del INF dentro de las células infectadas (Celedón y col.,1993). La proteína NS2 (al igual que NS1) actúa como una señal de regulación de la transcripción y también está involucrada en la exportación del complejo de RNPs desde el núcleo al citoplasma mediante su interacción con la proteína M1 durante la fase tardía del ciclo viral. En algunas cepas del virus, el segmento 2 contiene un marco de lectura alternativo capaz de producir una pequeña proteína de 87 aminoácidos denominada PB1-F2, y si bien su rol en el ciclo viral aún no está bien comprendido, se lo relaciona con la virulencia, alterando la membrana mitocondrial ocasionando la muerte celular (Sguazza y Bravi, 2019).

La HA es una glicoproteína que permite la unión de los viriones a receptores específicos presentes en la superficie de los glóbulos rojos, en los que produce un efecto de aglutinación. También es responsable de la adhesión del virus a la célula hospedadora en el comienzo del ciclo viral; la composición de aminoácidos y glúcidos de la molécula de HA determina el tropismo y el rango de hospedadores del virus. Una vez sintetizada esta proteína, una señal de direccionamiento la exporta hacia la membrana de la célula infectada donde sufre una serie de modificaciones post-traduccionales hasta alcanzar la constitución de la proteína madura. La NA es una glicoproteína con actividad enzimática que actúa como una sialidasa capaz de hidrolizar las moléculas de ácido siálico o N-acetilneuramínico, componente esencial de los receptores celulares. Su principal función es facilitar tanto la entrada como la

liberación del virus, escindiendo la unión que se establece entre el ácido siálico del receptor de la célula hospedadora y un azúcar adyacente de la HA del virus, lo que permite que la progenie viral escape de la célula una vez concluido el ciclo viral y se disemine a otras células (Timoney, 1996).

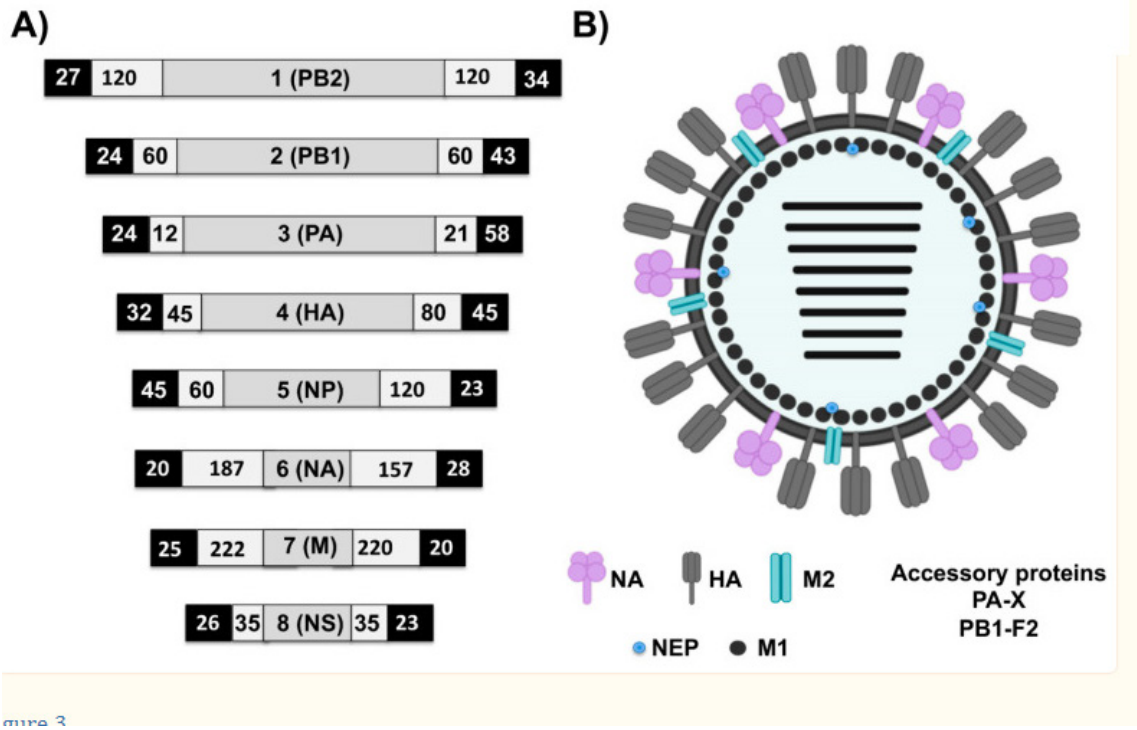


Figura n°1: Representación esquemática de la organización del genoma y la estructura del virus de la influenza A. A)- Organización del genoma de los ocho segmentos de genes de ARN de sentido negativo (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M y NS) del EIV. Todos los segmentos están numerados según la representación convencional de 3' a 5'. Los recuadros negros al final de cada segmento viral indican las regiones no codificantes. Los recuadros blancos muestran las señales de empaquetamiento presentes en los extremos 3' y 5' de cada segmento génico. B)- La arquitectura básica del EIV contiene glicoproteínas de superficie de envoltura: HA, NA y proteína del canal iónico M2, todas ellas incrustadas dentro de la envoltura de la bicapa lipídica derivada de la célula huésped. Inmediatamente debajo de la envoltura hay una capa bien organizada de proteínas M1 y NEP que rodean los ocho segmentos de ARN viral de sentido negativo (Oladunni, y Col., 2021).

1.2.3. Transmisión

La diseminación del EIV a otros equinos es a través de la tos y estornudos que contienen alta carga viral. Los caballos parcialmente inmunes se infectan, pero no se

enferman, por otro lado, los caballos inmunizados son refractarios a la enfermedad severa (Barrandeguy, 2007). El EIV tiene un corto periodo de incubación que varía entre 2 a 4 días, se caracteriza por su diseminación acelerada debido a la persistencia de los signos. La severidad de los signos clínicos depende de la dosis infectante al que ha sido expuesto el equino susceptible. La diseminación de la enfermedad se da en condiciones ideales cuando los equinos son sometidos a traslados de duración prolongada por tierra o aire, en ambientes poco ventilados. Es común, además que suceda durante el alojamiento para competencias deportivas, hipódromos, hospitales veterinarios, haras, ferias de animales, centros de entrenamiento, etc., generando las condiciones óptimas que facilitan el contagio por contacto estrecho entre animales estresados, y animales con signos típicos de la enfermedad (Beech, 1991). Figura n°2.

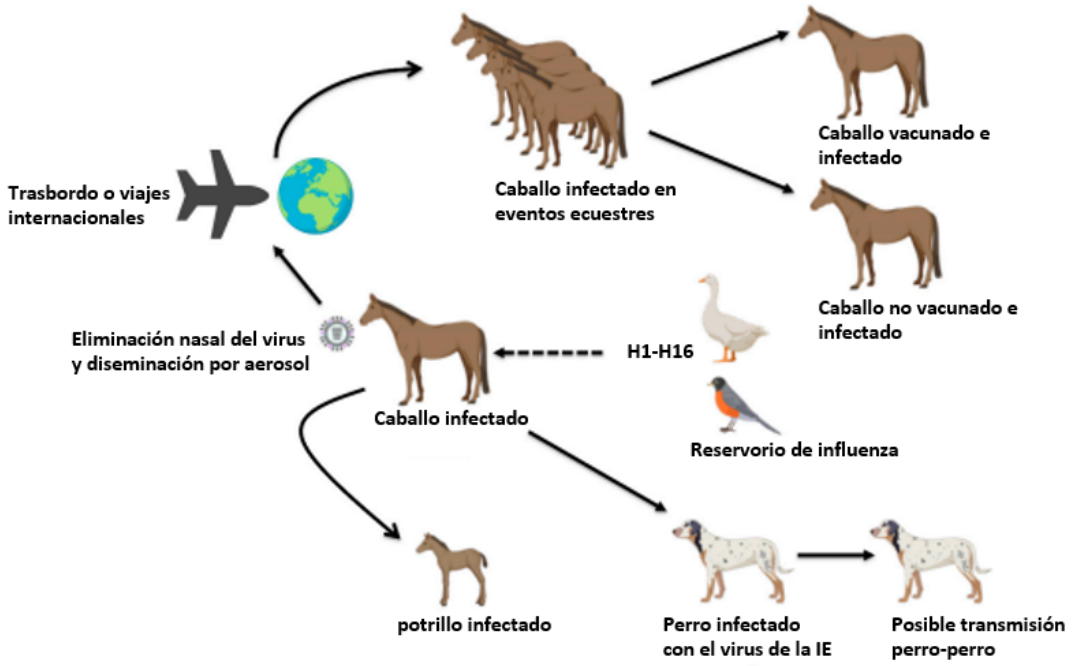


Figura n°2: Origen y modo de transmisión del EIV. Las aves acuáticas sirven como reservorio natural de la influenza aviar, los virus aviares se reconocen como progenitor del EIV. Después de la infección de un caballo, el virus puede propagarse a otros animales en gotitas de aerosol por tos o por transmisión a través de fómite. El transporte internacional de caballos facilita la propagación del virus a nuevas ubicaciones geográficas, especialmente durante eventos hípicos como carreras o espectáculos. Los perros también pueden infectarse y transmitir el virus a otros perros. Modificado de Oladunni y col., 2021.

1.2.4. Patogenia

La patogenicidad y la virulencia del virus están determinados por factores dependientes del hospedador como puede ser la presencia de receptores adecuados en la célula hospedadora, la presencia de enzimas celulares que permitan la entrada y

replicación viral, el estado de inmunocompetencia y la habilidad del sistema inmune para controlar la replicación viral con escasos daños colaterales normalmente asociados a la respuesta inflamatoria. También existen factores dependientes del virus, que incluyen la habilidad que poseen para unirse a la célula hospedadora, la restricción del efecto citopatogénico y la evasión a la respuesta inmune mediante la variación genética inducida por la presión de selección ejercida por la respuesta inmune. Los genes codificantes de las proteínas HA, NA, PB1 y NS están asociados con la patogenicidad del virus; los genes codificantes de las proteínas HA, NA y PB1 también determinan la transmisibilidad de las cepas de influenza (Mumford y col.,1990).

Como ya ha sido comentado, el EIV es altamente contagioso y se disemina rápidamente por transmisión transversal de un caballo a otro. Se multiplica en las células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior, produciendo inflamación de las membranas mucosas con descarga nasal serosa que puede terminar en mucopurulenta. También puede presentarse faringitis, laringitis y rinitis, lacrimación, aumento de la temperatura corporal (39 a 41 ºC), decaimiento, inapetencia y tos seca. Es frecuente observar otros signos como mialgias e inflamación de ganglios linfáticos submaxilares (Virmani y col., 2010; Acuña, 2006).

Los períodos de incubación que sobrepasen los 2 o 4 días están asociados a virus de menor virulencia que requieren varios ciclos replicativos para poder causar signos clínicos. La mayor descarga de virus ocurre en las primeras etapas de la enfermedad cuando la tos es severa. Puede haber equinos con enfermedad subclínica representando un factor muy importante en la diseminación de la enfermedad al ser difíciles de identificar (Castro, 2017).

La enfermedad respiratoria febril aguda característica de la gripe se complica con frecuencia por infecciones bacterianas secundarias responsables de las descargas mucopurulentas, especialmente en caballos no vacunados y-, estas condiciones pueden producir complicaciones y terminar en neumonía (Barrandeguy, 2007).

La mortalidad de la IE es relativamente baja cuando se habla de animales adultos, sin embargo, en potros que no cuentan con anticuerpos maternales o que viven en malas condiciones pueden desarrollar neumonía viral con desenlace fatal. En los equinos adultos la causa de la muerte es, en la mayoría de casos, por consecuencia de infecciones bacterianas secundarias, que conducen a pleuritis o neumonía (Acuña, 2006). Los efectos secundarios de la IE pueden variar entre faringitis crónica, enfisema alveolar y/o bronquiolitis crónica, provocando sinusitis o infecciones de la bolsa gutural. En aquellos animales que cuentan con vacunas o que han sido expuestos

previamente a la enfermedad los signos clínicos, son menos manifiestos siendo más difícil reconocer un brote de la enfermedad (Acuña, 2006).
Una vez pasada la enfermedad estos animales quedan normalmente protegidos frente a una nueva infección durante 4 meses (Castro, 2017).

1.2.5. Respuesta inmune

Los mecanismos del sistema inmune innato, cornetes y pelos nasales, barrido mucociliar, los péptidos antimicrobianos, etc. así como las características del epitelio de las mucosas que cubre el tracto respiratorio, representan la primera barrera de defensa inmune contra el EIV. Si el virus logra superarla con éxito, comienza a replicarse en las células del epitelio respiratorio dando lugar a la activación del sistema inmune innato temprano e inducible. Durante este proceso las células infectadas liberan citoquinas y quimiocinas que movilizan distintas células del sistema inmune innato (macrófagos residentes, células dendríticas, leucocitos, monocitos y células NK) que representan las herramientas que activan el sistema inmune innato inducible. Estas células cuentan con diversos tipos de receptores que permiten la detección tanto de moléculas propias ausentes, disminuidas o alteradas así como reconocimiento de PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, por su sigla en inglés) por medio de PRRs (Receptores de Reconocimiento de Patrones, por su sigla en inglés) (Sguazza y Bravi, 2019).
En el caso del virus de la gripe, los principales PRRs son TLR-7, TLR-8 y RIG-1 que reconocen las moléculas de ARN de simple cadena del virus y TLR-3 capaz de reconocer ARN de doble cadena que se forma durante la replicación del virus. La estimulación de estos TLRs induce la producción de INFs tipo I, siendo una de sus funciones la de incrementar la expresión de moléculas del CMH I en las células infectadas y CMH I y II en células dendríticas. Si bien la respuesta innata (tanto celular como humoral) puede no ser capaz de detener por completo la infección viral, retarda la replicación viral dándole tiempo a la activación de la respuesta adaptativa y se acople a los mecanismos del sistema inmune innato para poder eliminar en conjunto la infección (Castro, 2017). En los órganos linfáticos secundarios, los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos ($LTCD8^+$) se activan al reconocen péptidos antigénicos producto del procesamiento de proteínas internas del virus (especialmente NP y M1) en el contexto del CMH I. Conjuntamente los linfocitos T helper 1 $CD4^+$ (LTh1 $CD4^+$) también se activan reconociendo péptidos antigénicos específicos presentados en contexto del CMH tipo II y así activados son los responsables de secretar IL-2 e IFNγ que

completan la activación e inducen la proliferación de los LTCD8$^+$. Así activados en los órganos linfáticos secundarios, los LT CD8 se dirigen a la zona afectada en donde reconocen sobre las células infectadas, a los mismos péptidos antigénicos que los activaron, procediendo entonces a la eliminación de estas células induciendo muerte por apoptosis. La respuesta inmune celular, tanto del sistema inmune innato como adaptativo es efectiva, aunque la acción de los LTCD8$^+$ representa la defensa más eficiente contra el virus de la gripe ya que tienen la capacidad de proporcionar protección contra nuevas cepas de influenza (Landolt, 2014).

Los Linfocito B (LB) activados por el reconocimiento de epítopes nativos y específicos del virus son estimulados por IL-4 e IL-5 liberadas por LT CD4$^+$ folicular. Las células plasmáticas derivadas de estos LB son capaces de producir anticuerpos específicos contra las proteínas externas del virus (especialmente HA y NA). Aunque los anticuerpos no cumplen un papel preponderante durante las infecciones primarias con nuevas cepas del virus, la presencia de anticuerpos con algún grado de reactividad cruzada contra los mismos, también pueden contribuir, en parte, a detener la infección más rápidamente (Castro, 2017).

Por su parte el virus de la influenza tiene la capacidad de evadir al sistema inmune del hospedador a través de diversas estrategias. En primer lugar, es capaz de producir partículas virales defectuosas, que conservan los determinantes antigénicos de superficie que pueden neutralizar algunos anticuerpos circulantes. También se demostró que la proteína NS1 tiene la capacidad de bloquear la respuesta inmune mediada por INF dentro de las células infectadas, como ya ha sido comentado, sin embargo, la mejor estrategia que utiliza el virus para eludir al sistema inmune es mediante la producción de cambios antigénicos en sus proteínas de superficie. Las cepas resultantes de estos cambios antigénicos tendrán una ventaja selectiva frente al sistema inmune de la población, ya que la inmunidad previa mediada por anticuerpos dirigidos hacia esos antígenos, será relativamente ineficaz (Sguazza y Bravi, 2019).

1.3 DIAGNÓSTICO

1.3.1 Pruebas directas

Aislamiento viral

A pesar de que el aislamiento del EIV a partir de muestras clínicas es difícil y generalmente requiere mucho tiempo, es crucial para la investigación epidemiológica y determinar la vigencia de las cepas vacunales. Los mejores resultados para el aislamiento del virus a menudo se logran por cultivos a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo recolectadas en las primeras 24 a 48 horas después del inicio de la

enfermedad clínica. Como la duración de la diseminación nasal del virus suele ser breve en pacientes parcialmente inmunes, puede resultar útil tomar muestras de individuos inmunológicamente menos protegidos del grupo (por ejemplo, caballos más jóvenes, animales no vacunados) para aumentar la probabilidad de aislar el virus (OMSA; acceso 23 de Mayo 2021. (Landolt, 2014).

Pruebas moleculares

A diferencia del aislamiento viral, la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) no requiere la presencia de virus viables; por lo tanto, la sensibilidad de los métodos de RT-PCR es, a menudo, sustancialmente más alta que la del aislamiento viral. Sin embargo, debido a la alta sensibilidad del ensayo, esta técnica también es susceptible de producir resultados falsos positivos. Cualquier contaminante de ácido nucleico del virus de la influenza, por ejemplo, la administración de una vacuna de virus completo inactivado en el momento de la recolección de la muestra, puede producir un resultado falso positivo. Los ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizan una sonda fluorescente específica para tal objetivo y proporcionan resultados más rápidamente que los convencionales. Además, la PCR en tiempo real también se puede utilizar para la cuantificación de virus en muestras clínicas (OMSA).

Pruebas inmunológicas

Los ensayos destinados a detectar antígenos virales tienen un tiempo de respuesta más rápido que el aislamiento viral. La inmunofluorescencia directa se puede utilizar para detectar antígenos virales en una variada cantidad de muestras clínicas, como puede ser en tejidos congelados, improntas de tejidos, células de raspados nasales o lavados traqueales. La prueba de ELISA directa de captura ha sido validada originalmente para detectar el diagnóstico de influenza humana. Desde entonces los ELISA directos de captura que han sido validados para la detección del EIV, presentan la gran ventaja de arrojar resultados en el día, característica muy deseable durante un brote de IE (OMSA).

1.3.2. Pruebas indirectas

Detección de anticuerpos

Las pruebas serológicas siguen siendo una herramienta clave en el diagnóstico y la vigilancia del EIV. Para el diagnóstico indirecto de la enfermedad se utiliza la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA), a pesar de la imposibilidad de evitar reacciones cruzadas con anticuerpos vacunales. La extracción de sangre tomadas durante la fase aguda (al momento de la aparición de los signos) y en la fase convaleciente (2 o 3 semanas después de la aparición de los signos), nos permite

determinar seroconversión y confirmar la infección activa, ya que por definición la seroconversión es el aumento en tres o cuatro veces el título de anticuerpos. La mayoría de las pruebas serológicas no proporcionan información sobre si los anticuerpos existentes se produjeron en respuesta a una infección o por vacunación (OMSA).

Para eliminar los resultados falsos positivos por anticuerpos vacunales se han diseñado varias estrategias. Una de ellas fue el desarrollo de una vacuna vectorizada a monkypox, que carece del gen para la NA (Recombitek Influenza, Merial), por lo tanto, aquellos animales que tengan anticuerpos anti NA podrán ser clasificados como infectados o enfermos. A las vacunas que proporcionan esta estrategia de evitar falsos positivos por anticuerpos vacunales se las denomina DIVA (por su sigla en inglés de Diferentiating Infected from Vaccinated Animals) (Timoney,1996).

Otra estrategia para resolver este problema fue el desarrollo de un ELISA indirecto que contiene como antígeno a la proteína NS1, altamente conservada. Se ha demostrado que la NS1 del virus de la influenza A, al ser una proteína no estructural sirven como marcador de diagnóstico para detectar animales con infección activa evitando la detección de anticuerpos vacunales producto de la vacuna inactivada (Timoney, 1996).

1.4. CONTROL Y VACUNA

La IE es una enfermedad altamente contagiosa que compromete seriamente el movimiento de los caballos generando grandes pérdidas económicas, sobre todo en la industria equina, no solo por el cierre temporal de espacios de actividad ecuestre, sino también porque, al discontinuar el entrenamiento durante un tiempo conlleva a la merma en la performance. Cualquier programa de control se basa en 3 pilares: manejo, vacunación y diagnóstico. Frente a cualquier enfermedad de rápida diseminación la práctica de prevención más elemental es la cuarentena de los animales al ingresar a una población, así como el agrupamiento por categorías. El control del EIV se basa principalmente en protocolos de manejo adecuados y vacunación (OMSA, 2013). Desafortunadamente las medidas de manejo no se llevan a cabo de forma estricta, y por la patogenia de la enfermedad, el diagnostico serológico del EIV tiene más importancia en estudios epidemiológicos, por lo tanto, queda la vacunación como la principal y única pauta de control utilizada (Landolt, 2014).

La plataforma de vacunas históricamente utilizadas contra el EIV en stock de vacuna convencional, a partícula viral entera inactivada, al ser administradas por vía parenteral generan una respuesta humoral de corta duración a diferencia de lo que sucede durante una infección natural en la que la respuesta es tanto celular como

humoral y también más duradera. En las últimas dos décadas la estrategia de los nuevos desarrollos de vacunas fue imitar la estimulación del sistema inmune inducida por la infección por el EIV. En este sentido, el foco del desarrollo de la vacuna contra este virus se centra en el desarrollo de inmunógenos vacunales vivos atenuados del EIV, plásmidos de ADN o vectores de poxvirus que codifican proteínas del virus (Paillot, 2014). Hasta el momento en nuestro país solo se permite la comercialización de vacunas inactivadas, las que, como, se mencionó, la protección vacunal que confieren está fuertemente asociada con la respuesta humoral contra HA. En cuanto al isotipo que inducen este tipo de vacunas, se determinó que la IgG3/5 es el mayoritario, pero no está relacionado con la protección viral, es por esto que las vacunas inactivadas requieren del agregado de adyuvantes. El objetivo de los adyuvantes es mejorar el nivel, en cuanto a calidad inmunológica, título y duración de la respuesta inmune, no obstante, no se ha logrado inducir una respuesta celular específica contra el EIV. Los adyuvantes más comunes utilizados en vacunas inactivadas contra la IE son el fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio (Hannant y col., 1994). De todos modos, las vacunas inactivadas requieren ser aplicadas 2 o 3 veces para lograr una respuesta vacunal protectora (Sguazza, Bravi; 2019).

También existe una vacuna inactivada de administración local adyuvada con toxina colérica B que genera respuesta local protectiva. Los adyuvantes eventualmente pueden generar accidentes vacunales como efectos adversos (dolor e hinchazón local y, aumento de la temperatura corporal) (Paillot, 2006).

Las vacunas a subunidades son a glicoproteínas HA y NA purificadas, normalmente adyuvadas con saponina (Quil A) o integrada en complejos inmunoestimulantes (ISCOM™) para mejorar su antigenicidad. Esta última formulación ha demostrado generar una mejor respuesta humoral que las vacunas a partícula viral inactivada. Sin embargo, esta formulación tampoco es capaz de generar una respuesta inmune celular protectiva. (Mumford y col., 1994).

En los últimos 20 años se está estudiando la posibilidad de desarrollo de vacunas a virus vivos/vectores con el objetivo de emular una infección controlada y poder generar respuesta inmune humoral y celular. También se ha experimentado con virus de influenza de distintas especies reagrupados, a partir del reordenamiento genético generando un subtipo distinto de influenza A atenuado con crecimiento limitado en mamíferos. A parte de no generar respuesta protectora prolongada, reviste un peligro en sanidad pública (Paillot y col., 2006).

Las vacunas de nueva generación a ADN dan como resultado la expresión *in vivo* de proteínas antigénicas, lo que conduce a la estimulación de respuesta inmune tanto humoral como celular, generando una respuesta inmunitaria protectora prolongada y específica contra el EIV en comparación con el stock de vacunas convencionales a virus inactivado. Sin embargo, los estudios han mostrado cierta variabilidad en el nivel de protección frente a los signos clínicos de la enfermedad, así como resultados disimiles en relación a la prevención de la diseminación del virus. Otra desventaja es el método de administración poco conveniente para la práctica veterinaria en equinos. La vacuna a ADN contra el virus del Nilo Occidental para equinos es la única autorizada hasta el momento por Estados Unidos (Paillot y col., 2006).

En la Unión Europea, desde el 2003 se comercializa una vacuna basada en canarypox como vector recombinante replicativo contra el EIV (ProteqFlu®4; Merial Ltd., Reino Unido). Las vacunas vectorizadas son seguras, ya que el virus de la viruela del canario induce una infección abortiva en células de mamífero. Esta vacuna contiene dos canarypox recombinantes que codifican la HA de las cepas Newmarket/2/93 y Kentucky/94 (cepas europeas y americanas, respectivamente) y como adyuvante contiene Carbormer 974P (Paillot y col., 2006; Soboll y col., 2010).

Otras vacunas de nueva generación son aquellas vacunas diseñadas por genética inversa, método eficiente que permite la generación de virus de influenza recombinantes en plásmidos de ADN replicativos, que codifican un extremo carboxilo de la proteína NS1 truncada. Sin embargo, son necesarias más pruebas en caballos para evaluar su antigenicidad y eficacia en la protección contra la infección por desafío (Oladunni, y col., 2021).

A pesar del hecho que las vacunas contra el EIV son generalmente muy eficaces, continúan ocurriendo brotes de esta enfermedad. La eficacia de las vacunas depende mayormente de la actualización periódica de las cepas utilizadas para su producción, con aquellas que se hallan circulando en la población equina.

En la Argentina, la vacunación contra la IE no solo está permitida, sino que es la única obligatoria para todos los équidos que permanezcan o se movilicen hacia un remate feria, exposición, establecimiento identificado como hipódromo, club hípico, stud, caballeriza, centro tradicionalista y/o a distintas actividades ecuestres que concentren équidos para trote, pato, polo, salto, doma, jineteada, prueba completa y endurance. Debe ser aplicada de manera sistemática cada 3 meses en los animales que se mantienen en actividad deportiva a lo largo del año, así como aquellos que deban trasladarse, quedando exentos los animales que son destinados a faena y los que

permanecen en los establecimientos. Debido a la presencia de anticuerpos de origen materno, los potros no deben vacunarse antes de los 6 meses de edad. Para las vacunas inactivadas, la primovacunacion en potrillos o adultos debe incluir 3 dosis, incluso cuando los laboratorios productores solo recomienden 2 dosis iniciales. Se recomienda un intervalo de 3 a 4 semanas entre la primera y la segunda dosis, y un intervalo más largo de 3 a 4 meses entre la segunda y la tercera dosis (Nina y col., 2020). La vacuna intranasal viva modificada solo requiere una única dosis inicial, seguida de dosis de refuerzo a intervalos de 6 meses (Landolt, 2014).

Como consecuencia de la deriva antigénica del EIV, si la vacuna no contiene cepas de virus actualizadas, la misma pierde capacidad protectora y, en consecuencia, la infección en un animal parcialmente inmunizado produce eliminación de virus con el consiguiente riesgo de infectar a otros huéspedes susceptibles (Castro, 2017).

Una población de caballos sin vacunar y sin exposición previa al virus, tiene una tasa de infección próxima al 100%. La mortalidad es rara, pero en caso de afectar a yeguas preñadas, la fiebre prolongada puede producir aborto. Afecta a equinos de todas las edades, pero mayormente a jóvenes. Los potrillos debilitados que nacen en un brote de Influenza pueden morir por neumonías, los animales de mayor edad se curan al cabo de dos semanas de no presentar complicaciones. Se estima que el 70% de una población debe estar inmunizada para prevenir brotes de influenza. (Landolt, 2014; Sguazza y Bravi, 2019).

Para los equinos que no cuenten con antecedentes de vacunación (primo vacunados), la vacuna debe aplicarse con un plazo mínimo de quince días previos a la movilización. Los hipódromos, centros y clubes deportivos, instituciones de defensa nacional, seguridad pública, jardines zoológicos u otros organismos oficiales, en tanto cuenten con servicios veterinarios privados acreditados, podrán adoptar planes de vacunación particulares contra IE, siempre que tiendan a mejorar el nivel inmunitario de la población de équidos, para lo cual previamente deberán solicitar y obtener la autorización del SENASA (Perglione, 2016). A los fines de acreditar la vacunación contra la IE, cada équido vacunado e identificado de manera individual debe contar con la estampilla oficial adherida a la Libreta Sanitaria Equina o Pasaporte Equino u otro documento que sea aprobado por el SENASA a tal fin, en forma conjunta con el detalle de la fecha de su aplicación. La vacunación debe ser aplicada y certificada por un Médico Veterinario privado acreditado o por un Médico Veterinario oficial del SENASA. (http://www.fedecuarg.com.ar/uploads/documentos/senasa-equinos-resolucin-n-521-2016.pdf) acceso 20 de Enero del 2021.

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2.1. Objetivo general

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia y título de anticuerpos específicos contra la cepa 2001 de IE aislada en el Laboratorio (LAVIR)

2.2 Objetivos específicos

- Adquirir destrezas en la preparación de material, realización, lectura e interpretación de la prueba de HA para titular virus de la Influenza equina.
-Adquirir destrezas en la preparación de material, realización, lectura e interpretación de la prueba de IHA para titular sueros de equinos vacunados contra la IE y no vacunados.
-Determinar la seroprevalencia de IE.
-Generar material didáctico para la enseñanza de la técnica de HA e IHA.

3. HIPÓTESIS

Los equinos vacunados presentan nivel protectivo de anticuerpos contra la cepa de Influenza del año 2001.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Titulación viral por la técnica de la Hemoaglutinación (HA)

Virus

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó una cepa del VIE subtipo 2 (H3N8) aislada en el año 2001 en la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) denominado A/Eq/La Plata 2001.

4.1.2. Amplificación viral

Fundamento

El stock viral, durante su conservación por tiempo prolongado, comunmente pierde título por degradación de las partículas virales, por lo tanto, se debe realizar un paso de amplificación viral de rutina justo antes de realizar la prueba de HA e IHA con el propósito de obtener el más alto título posible del virus qué se utilizará como antígeno para la prueba serológica de inhibición de la hemoaglutinación IHA.

Técnica

Se inocularon 6 huevos en cavidad alantoidea, con 150 µl de una dilución 1/5 de stock viral–en PBS estéril con el agregado de antibióticos (Penicilina – Estreptomicina: 100 U/ml y 100 µg/ml respectivamente). Posteriormente fueron incubados a 35ºC durante tres días, procurando movimientos rotatorios para la sobrevida de los embriones.

Transcurrido el tiempo de incubación, se colocaron a 4ºC durante 6 horas y luego se extrajo el líquido alantoideo en forma estéril, por medio de una jeringa. Se obtuvieron 60 ml de líquido alantoideo, que luego fue clarificado por centrifugación a 5.000 rpm durante 15 minutos y posteriormente conservados a 4 ºC hasta su titulación por hemoaglutinación (HA). Ver anexo I.

4.1.3 Glóbulos rojos

Fundamento

Los glóbulos rojos (GR) son el sustrato a través del cual se observarán las reacciones tanto en la HA como en la IHA. Revelan el título del stock viral en la prueba de HA y al ser utilizados en la prueba de la IHA revelarán la ausencia o presencia de anticuerpos específicos anti EIV.

Técnica

Los GR se obtuvieron a partir de 5 ml de sangre de pollo por punción de la vena radial. La sangre fue rápidamente traspasada a un tubo Falcon conteniendo 25 ml de solución de Alsever (2.05% dextrosa, 0.8% citrato de sodio, 0.055% ácido cítrico, 0.42% cloruro de sodio) agitando suavemente para evitar la formación de coágulos.

La suspensión de GR se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet de GR resultante se lavó en 3 oportunidades con 25 ml de PBS cada vez. Finalizados los lavados los GR fueron diluidos en PBS para obtener una concentración final de 0.75%, dilución que fue almacenada a 4 °C para su utilización en las técnicas de HA e IHA.

4.2. Test de Hemoaglutinación (HA)

Fundamento

La prueba de HA es el método para titular la carga viral de un stock viral de IE para poder ser utilizado como antígeno reactivo en la prueba de IHA. Se basa en la característica bioquímica que tienen los virus de familias hemoaglutinantes y en particular el virus de la IE de aglutinar GR de pollo. Se realizan diluciones seriadas en base 2 del stock viral y el título hemoaglutinante se define como la inversa de la máxima dilución donde se observa aglutinación franca de los GR, lo que constituye una medida indirecta de la cantidad de partículas virales (figura n° 3).

Técnica

En una placa de 96 pocillos (con fondo en V), se colocaron 100 µl del producto de la amplificación viral (sección 4.1.2) en el primer pocillo de una fila y se agregaron 50 µl de PBS en todos los pocillos restante de la fila, luego se hicieron diluciones seriadas (en base 2) trasvasando 50 µl del primer pocillo al segundo y así sucesivamente hasta el anteúltimo. Una vez que se realizaron las diluciones, se colocaron 50 µl de una solución al 0,75% de GR de pollo en PBS, en la totalidad de los pocillos incluyendo el último. Este último pocillo, que no fue empleado para hacer las diluciones del virus (conteniendo solamente los 50 µl de PBS originales) fue utilizado como control de GR. Después de homogeneizar suavemente la placa, se la dejó sobre una superficie lisa a temperatura ambiente durante 45 minutos, al cabo del cual se realiza la lectura y determinación del título viral.

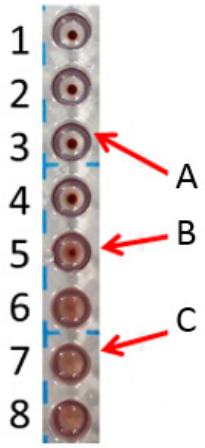


Figura n° 3: Interpretación de resultados dela técnica de hemoaglutinación.
A: (No hemoaglutinación): Los GR sedimentan en el fondo del pocillo observándose como un botón.
B: (Hemoaglutinación parcial): Se observa un anillo de células aglutinadas alrededor de un botón en el centro. No se lee como punto final de HA.
C: (Hemoaglutinación completa): Los GR forman una capa fina y bien distribuida en el pocillo. Se lee como punto final de la HA.

4.3. Titulación de los sueros problemas por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IHA)

Fundamento

La IHA es un método sensible y específico que se basa en la neutralización de la capacidad hemoaglutinante de un virus en presencia de anticuerpos específicos que reconocen a las hemoaglutininas, formándose un complejo antígeno-anticuerpo. La reacción de neutralización viral se visualiza por la formación de un botón de GR en el fondo del pocillo.

Antígeno viral

El virus A/Eq/La Plata 2001 fue titulado como se describe en la sección 4.2.1. y se utilizó como antígeno reactivo en una concentración de 4 UHA.

Glóbulos rojos

Se utilizaron GR de pollo al 0.75% en PBS obtenidos según se describe en la sección 4.1.3.

Sueros

Se obtuvieron 50 muestras sanguíneas de equinos vacunados trimestralmente contra influenza equina, provenientes de la ONG ¨Ayuda a Caballos Maltratados¨ (ACMA), de Alejandro Kohn, Provincia de Buenos Aires, y 50 sueros de animales no vacunados de Pereyra. Las mismas se desueraron y fueron pre tratadas con periodato de potasio para eliminar hemoaglutininas no específicas. Finalmente, los sueros fueron descomplementados a 56 °C durante 30 minutos en baño térmico y fueron guardados a -20°C hasta el momento de su utilización.

Técnica

La titulación de anticuerpos por la prueba de IHA, se realizó en placas de 96 pocillos con fondo en V. Inicialmente y por duplicado, se colocaron 50 µl de cada uno de los sueros en la primera columna de la placa. A continuación, se agregaron 25 µl de PBS en los pocillos restantes de la placa y luego se realizaron diluciones seriadas (en base 2) trasvasando 25 µl de suero desde la primera columna hasta la última con una micropipeta multicanal (descartando los 25 µl sobrantes de la última columna). Después, se agregaron 25 µl de la suspensión viral con un título de 4 UHA. Posteriormente se homogeneizaron suavemente las placas y se las dejaron tapadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por último, se colocaron en todos los pocillos de la totalidad de las placas 50 µl de la solución de GR de pollo al 0,75%. Se agitó suavemente cada placa y se las volvió a incubar, tapadas, a temperatura ambiente durante 45 minutos. Finalizado este tiempo se procedió a la lectura de las placas.

Las pruebas diagnósticas y técnicas utilizadas se realizaron según protocolo de OMSA (https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.05.07_EQ_INF.pdf).

4.4 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos para cada uno de los grupos, vacunados y no vacunados, se analizaron estadísticamente para determinar la existencia de diferencias significativas entre los mismos. Para tal fin se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurión XV versión 15.2.05 (Statpoint Inc. 2007). Previamente se realizó una transformación

logarítmica de los datos por el Test de Levene con un nivel de confianza del 95,0%, para comprobar que no existiera una diferencia significativa entre las desviaciones estándar de cada grupo. Luego los datos fueron analizados por ANOVA de una vía, con un 0,05 de incertidumbre y finalmente se realizó un Test de Rangos Múltiples por el método de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey con un 95% de confianza.

5. RESULTADOS

5.1. Titulación del stock viral por la técnica de la Hemoaglutinación

El título hemoaglutinante obtenido como resultado de la técnica de HA a partir de la cepa A/Eq/La Plata 2001 fue de 1/128 para 1 UHA y se utilizó una dilución 1/32 para obtener 4 UHA como concentración viral para la realización de la IHA.

5.2. Titulación de los sueros problemas por la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación

Los resultados de la lectura de la prueba de IHA arrojaron los siguientes títulos para los dos grupos de equinos (tabla n° 3):

TABLA N°3 Títulos de anticuerpos contra influencia equina detectados mediante el teste de inhibición de hemoaglutinación

VACUNADOS				NO VACUNADOS			
MUESTRA	TITULO (HI)	MUESTRA	TITULO (HI)	MUESTRA	TITULO (HI)	MUESTRA	TITULO (HI)
1	16	26	256	1	16	26	64
2	4	27	32	2	256	27	8
3	64	28	8	3	256	28	128
4	16	29	64	4	256	29	256
5	64	30	256	5	256	30	128
6	64	31	128	6	256	31	128
7	32	32	128	7	128	32	128
8	256	33	32	8	128	33	128
9	256	34	32	9	64	34	128
10	256	35	32	10	256	35	128
11	256	36	64	11	128	36	128
12	256	37	64	12	64	37	128
13	256	38	256	13	128	38	128
14	256	39	256	14	32	39	128
15	256	40	256	15	32	40	128
16	128	41	128	16	64	41	128
17	64	42	128	17	64	42	32
18	8	43	128	18	128	43	64
19	256	44	64	19	128	44	64
20	256	45	64	20	32	45	64
21	256	46	64	21	64	46	64
22	256	47	64	22	64	47	64
23	256	48	64	23	64	48	16
24	256	49	256	24	64	49	32
25	256	50		25	64	50	32

HI: Inhibición de hemoaglutinación

Para clasificar a los animales según el nivel de protección contra la cepa 2001 se resolvió hacerlo según los autores Muñoz González y col. (2019), tomándose los siguientes valores para cada clase: a) protegidos, título igual o mayor 1/128; b) parcialmente protegidos, títulos entre 1/16 y 1/64; y c) no protegidos, título igual o menor a 1/8 (figura n°4). En el establecimiento (ACMA) donde se vacunó según el calendario sugerido por SENASA (trimestralmente), el 54 % de los animales fueron considerados protegidos, 40% parcialmente protegidos y solo un 6% fueron clasificados como no protegidos. Los caballos del grupo no vacunados tuvieron un 52% de los animales protegidos, 46% parcialmente protegidos y solo un 2% fueron clasificados como no protegidos (tabla n°4).

Tabla 4. Clasificación de los equinos según el título inhibidor de la hemoaglutinación contra el virus de Influenza equina

	No protegidos (IHA < 16)	Parcialmente protegidos	Protegidos (IHA > 128)
ACMA	3 (6%)	20 (40%)	27 (54%)
PEREYRA	1 (2%)	23 (46%)	26 (52%)

Para realizar el análisis de varianza con datos normalizados, se realizó una transformación logarítmica en base 10 de los resultados. Para demostrar que la desviación estándar de los valores de Log_{10} (IHA) obtenidos luego de la transformación dentro de cada grupo era la misma, se empleó el Test de Levene con un nivel de confianza del 95,0%, con el que se obtuvo un resultado de P>0,846.

Ya que el valor de P hallado fue mayor a 0,05, se pudo demostrar que no existía una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza. Una vez eliminado el sesgo de los datos, se realizó un análisis de varianza del Log_{10} (HI) por grupo (tabla n°5):

Tabla n°5**:** Análisis de Varianza (ANOVA) para Log_{10} de unidades inhibidoras de la hemoaglutinación (UIHA) por grupos (vacunados y no vacunados)

	ACMA	PEREYRA	TOTAL
N	50	50	100
∑X	98.4368	96.3296	194.7664
Mean	1.9687	1.9266	1.948
∑X2	205.2522	191.2062	396.4584
Std.Dev.	0.4835	0.3386	0.4158

Source	SS	df	MS	
Between-treatments	0.0444	1	0.0444	F = 0.25486
Within-treatments	17.0744	98	0.1742	
Total	17.1188	99		

Al realizar una comparación, mediante una prueba de rangos múltiples utilizando el Test de Tukey (tabla n°6), para determinar si las medias de los animales protegidos (total o parcialmente) y los no protegidos, presentaban diferencias significativas entre ambos grupos:

Tabla n°6: Test de Rangos Múltiples por el método de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. 95% de confianza

Treatments pair	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inferfence
ACMA vs PEREYRA	2.7655	0.0533700	insignificant

Al realizar análisis de Varianza (ANOVA) (tabla n° 7) para Log10 de uHI por grupos (vacunados y no vacunados) pero en esta oportunidad entre las categorías protegidos (IHA>128) y no protegidos (IHA<8)n no hubo diferencias significativas.

Tabla n°7: Análisis de Varianza entre grupos de protegidos (IHA>128)

Treatment →	ACMA	PEREYRA	Pooled Total
observations N	27	26	53
sum ∑xi∑xi	63.2163	56.8947	120.1110
mean ¯xx¯	2.3413	2.1883	2.2662
sum of squares ∑x2i∑xi2	148.4340	124.9637	273.3977
sample variance s2s2	0.0163	0.0185	0.0230
sample std. dev. ss	0.1275	0.1362	0.1517
std. dev. of mean SE¯xSEx¯	0.0245	0.0267	0.0208

source	sum of squares SS	degrees of freedom νν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	0.3104	1	0.3104	17.8593	9.8430e-05
error	0.8864	51	0.0174		
total	1.1969	52			

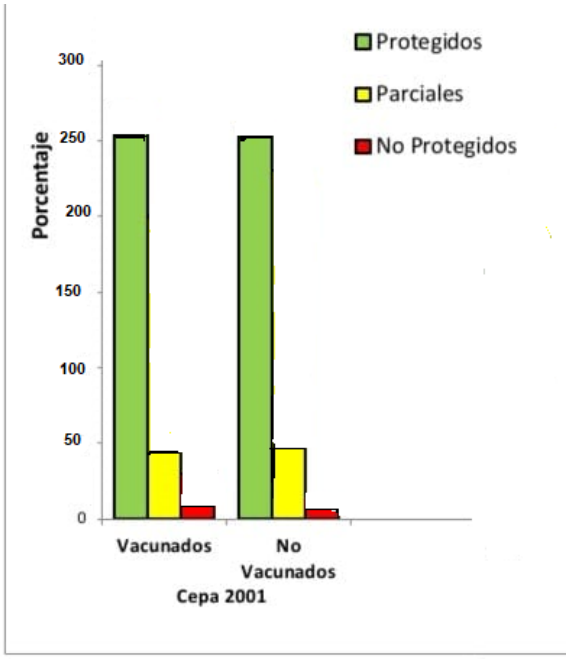
El valor p correspondiente al estadístico F de ANOVA unidireccional es inferior a 0,05, lo que sugiere que uno o más tratamientos son significativamente diferentes.

La comparación, mediante una prueba de rangos múltiples utilizando el Test de Tukey (tabla n°8), se determinó que las medias de los animales protegidos (IHA>128) y no protegidos (IHA<8) presentan diferencias significativas.

Tabla n°8: Resultados Tukey HSD.

treatments pair	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inferfence
A vs B	5.9765	0.0010053	** p<0.01

Figura n°4: comparación de las tres categorías de protección de los caballos de la ONG ACAM (vacunados) y los caballos de Pereyra (no vacunados).



6 DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Desde 1995 se ha desarrollado un programa de vigilancia mundial de la IE. Los Laboratorios de referencia de la OMSA y otros laboratorios colaboradores recopilan datos sobre brotes de IE y variación de cepas los que son revisados anualmente por un Panel de Vigilancia de Expertos. Este panel hace recomendaciones sobre la necesidad de actualizar las vacunas, luego son publicadas en el Boletín de la OMSA y en el sitio web de la OMSA. Los criterios para la actualización de las vacunas contra la IE se basan en el análisis de cambios antigénicos, cambios genéticos y, en ocasiones se basa en datos de desafío experimental. Muchas vacunas todavía contienen la cepa H7N7, sin embargo, el Panel de Expertos en Vigilancia han recomendado que se omita el componente H7N7 ya que los informes de infecciones con este subtipo no se han comprobado durante los últimos 30 años. Así mismo se ha determinado que variantes antigénicas y genéticas del serotipo H3N8 co-circulan (Bryant y col., 2009; Favaroy col., 2018) lo que hace fundamental incluir cepas epidemiológicamente relevantes a la formulación de las vacunas.

Las vacunas que se utilizan actualmente en el país contienen el serotipo A/EQ/2 Florida (H3N8), aunque lamentablemente muchos laboratorios productores de vacunas no comparten esta información en las páginas de_____vademécum visitadas. (https://www.sani.com.ar/lista.php?src=main&lab=&Submit_SAN=&esp%5B%5D=7&acc_pri%5B%5D=8-) acceso 10 de Julio 2020).

El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la presencia y título de anticuerpos específicos contra la cepa A/Eq/La Plata 2001 de IE aislada en el Laboratorio de Virología (LAVIR) de la Facultad de Ciencias Veterinarias- UNLP durante el brote de 2018.

Según los resultados a la prueba de IHA y los valores de corte para la categorización de los animales, no permiten inferir si los títulos de anticuerpos presentes en los animales protegidos del grupo no vacunados, se debieron a la presencia de anticuerpos por una infección natural. No obstante, basándonos en el trabajo de Muñoz González y col. (2019), el número de animales protegidos en el grupo de vacunados representa el 54%, este valor inferior a lo esperado podría deberse a que solo el 24% de los caballos infectados durante el brote del año 2018 fueron vacunados con una vacuna actualizada conteniendo las cepas Florida clado 1 y 2 (A/eq/Argentina/E2345-1/2012 y A/eq/Meath/2007, respectivamente). Los análisis que comparan la HA de las cepas circulantes durante el brote y la cepa Florida clado 1 contenida en la vacuna actualizada utilizada en Argentina (A/eq/ Argentina/E2345-1/2012), muestran que existen seis sustituciones de aminoácidos, una de ellas en el sitio antigénico B y otra en el sitio antigénico E. Considerando que las cepas utilizadas en esta vacuna y las que circularon en Argentina en 2018 pertenecen al clado 1 de Florida, los cambios de aminoácidos que se produjeron en la HA y NA entre ambas cepas no deberían afectar la eficacia de la vacuna (Olguín Perglione, 2019). Es así que podría suponerse que los equinos vacunados de este estudio clasificados como protegidos, fueron inmunizados con una vacuna actualizada que contenía las cepas Florida clado 1 y 2 (A/eq/Argentina/E2345-1/2012 y A/eq/Meath/2007, respectivamente), alcanzando títulos de anticuerpos protectivos detectables ante la técnica de IHA.

Los estudios epidemiológicos del brote de IE en Argentina sugieren que el 76% de los equinos vacunados, pero que igualmente enfermaron, fueron inmunizados con una vacuna desactualizada formulada con la cepa A/eq/Kentucky/1997, filogenéticamente distante de las cepas del VIE 2018 de Argentina (Resolución SENASA 521/2016). Como mencionamos, el análisis de las secuencias de aminoácidos de HA mostró que entre A/eq/Kentucky/97 y las cepas que circulan actualmente, demostraron sustituciones críticas de aminoácidos en sitios de importancia inmunogénica sugiriendo una merma en la eficacia de la vacuna (Woodward, 2015). El alto número de animales parcialmente protegidos en ambos grupos podría deberse a la utilización de una vacuna desactualizada que indujo títulos en el rango de las categorías parcialmente protegidas.

Los resultados estadísticos refuerzan estos datos ya que el análisis de ANOVA de ambos grupos (vacunados y no vacunados) arrojó un valor de *p* mayor que 0,05 (p = 0.61481), comprobándose que no existe diferencias estadísticamente significativas entre la media del Log10 (IHA) de ambos grupos, con un nivel de confianza del 95%. Estos resultados comprueban que la población vacunada se comportó de la misma manera que la población no vacunada lo que podría deberse a un escape inmunológico, comportamiento esperable de una cepa epizoótica.

Los animales no vacunados, contrariamente a lo esperado presentan altos números de anticuerpos generando mayor número de animales protegidos totales (parcialmente protegidos y protegidos) comparado con el grupo de vacunados. Este fenómeno podría deberse a que en estos animales es mucho más frecuente la infección natural por distintos tipos de cepas año tras año, lo que se traduce en una respuesta inmune poliespecífica favoreciendo una protección cruzada frente a distintas cepas. Sumado a esto, las infecciones naturales generan una inmunidad activa más duraderas que la inducida por la vacunación, lo que podría explicar el inesperadamente alto porcentaje de animales parcialmente protegidos registrado en la población no vacunada.

Otra explicación, qué potencia la anterior, es la característica de la respuesta inmune a la infección respecto a la respuesta inmune vacunal. Esta última siempre es de menor intensidad y sobre todo si se trata de vacuna inactivada con cepas que no son exactamente las circulantes. La respuesta a infección natural, no solo es de mayor intensidad y más duradera, sino que los animales no vacunados están más expuestos a infectarse y enfermarse año a año con las distintas cepas circulantes, lo que se traduce en una respuesta inmune específica favoreciendo una protección cruzada frente a distintas cepas.

Sin embargo, al comparar individualmente las tres categorías entre grupos vacunados y no vacunados se observaron diferencias significativas en función del título entre las categorías de animales protegidos (>o= 1/128). la diferencia entre el número de animales vacunados con título >o= 1/256 es significativamente mayor en el grupo de vacunados en comparación al grupo de no vacunados. Esto podría deberse a que el grupo de animales de ACMA fue vacunado con vacunas actualizadas y mayor periodicidad, 4 veces al año, es por eso que el grupo de protegidos respondió con títulos más altos

Teniendo en cuenta lo analizado, podemos concluir que la importancia de la vigilancia epidemiológica, su aplicación en la actualización de la formulación de las vacunas comerciales, así como la vacunación, respetando los protocolos propuestos por la autoridad sanitaria, conforman las medidas de manejo apropiadas para obtener una respuesta inmune específica protectora que tiene como objetivo, mantener una protección poblacional tal que prevenga futuros brotes como el ocurrido en el 2018.

BIBLIOGRAFIA

I. Acuña González, P. N. (2011). Evaluación de anticuerpos neutralizantes contra influenza equina y herpes equino-4 en equinos residentes del Hipodromo Nacional de Marroñas durante un brote de sintomatología compatible con enfermedades respiratorias.

II. Barrandeguy, M. (2007). Influenza equina, actualización y situación en la argentina. Recuperado el 10 de octubre de 2018, de http://www.fvet.uba.ar/equinos/eq2/INFLUENZA.pdf

III. Berríos, P., & Celedón, M. O. (1992). Influenza equina en Chile (1963-1992). *Avances en Ciencias Veterinarias*, *7*(1).

IV. Casanova, A., Martínez, I., & Román, M. (1977). Aislamiento y tipificación del virus de la influenza equina en Chile. *Arch. Med. Vet*, *9*(2), 91-93.

V. Castro Janer, E. (2017.). *Virus de influenza equina y de rioneumonitis viral equina : estudio de detección caracterización y de respuesta inmune en los caballos de deporte del Uruguay.* Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria.

VI. Celedón V., M., Palominos S., L., Santibáñez Z., M., & Berríos E., P. (1993). Caracterización del virus influenza equina cepas A/equi/1/Santiago 77 (h7n7) y A/equi/2/Santiago 85 (H3N8)

VII. Chambers, T. M., Holland, R. E., Tudor, L. R., Townsend, H. G. G., Cook, A., Bogdan, J., ... & Sebring, R. W. (2001). A new modified live equine influenza virus vaccine: phenotypic stability, restricted spread and efficacy against heterologous virus challenge. *Equine veterinary journal*, *33*(7), 630-636.

VIII. Chambers, T. M., Quinlivan, M., Sturgill, T., Cullinane, A., Horohov, D. W., Zamarin, D., ... & Palese, P. (2009). Influenza A viruses with truncated NS1 as modified live virus vaccines: pilot studies of safety and efficacy in horses. *Equine veterinary journal*, *41*(1), 87-9.

IX. CORDO, Sandra M. Generalidades de los RNA virus.

X. Código Sanitario para los Animales Terrestres, Volumen II, 2013; http: // www.oie.int/).

XI. DalyJM, NewtonJR, MumfordJA. (2004) Current perspectives on control of equine influenza. Review article. Vet. Res.35:411-423

XII. (Durante, E., Marcos, A., Ayerbe, M., Chiricosta, A., Segato, L., Donato, M. E., ... & Carballo Longo, M. (2017). Prevalencia de anticuerpos contra virus de influenza equina en equinos deportivos de la República Argentina durante 2015 y 2016. *Analecta Veterinaria*, *37*.)

XIII. Etchegaray, P. B. Influenza equina: actualización.

XIV. GUO, Y. WANG, M. ZHENG, S. WANG, CHELA, P. 1991. Aetiologic study of an influenza-like epidemic in horses in China. Acta Virol. 35: 190-195.

XV. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/64526

XVI. https://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica-/informaciones-especificas-y-recomendaciones/gripe-equina/

XVII. https://www.google.com/url?q=https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadenaanimal/equinos/equinos-produccion-primaria/influenza-equina&sa=D&ust=1581425797424000&usg=AFQjCNFAbQCCXii6i4zl4KfCasoXLvB7rw

XVIII. http://cvpba.org/wp-content/uploads/2018/05/INFORME-CVP-INFLUENZA-EQUINA-EN-LA-REPUBLICA-ARGENTINA-Abril-2018.pdf

XIX. http://www.fedecuarg.com.ar/uploads/documentos/senasa-equinos-resolucin-n-521-2016.pdf

XX. https://www.zoetis.es/conditions/caballos/influenza-equina.aspx

XXI. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.05.07_EQ_INF.pdf

XXII. http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2016barberoeduardoesteban.pdf

XXIII. Kuri-Morales, Pablo, Betancourt-Cravioto, Miguel, Velázquez-Monroy, Oscar, Alvarez-Lucas, Carlos, & Tapia-Conyer, Roberto. (2006). Pandemia de influenza: la respuesta de México. *Salud Pública de México*, *48*(1), 72-79. Recuperado en 24 de agosto de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342006000100011&lng=es&tlng=es

XXIV. Landolt GA. Equine influenza virus. Vet Clin North Am Equine Pract. 2014 Dec;30(3):507-22. doi: 10.1016/j.cveq.2014.08.003. Epub 2014 Oct 3. PMID: 25282321. 2_https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.003

XXV. Manley Barber, Lindsay Robin. "Análisis retrospectivo de un brote de influenza equina en equinos del Ejército de Chile en la Región Metropolitana durante el año 2006." (2008).

XXVI. Muñoz, V., Vicente, M., Aguilera, E., & Berrios, P. (1979). Brote de influenza equina en Chile. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP); 86 (4), abr. 1979*.

XXVII. Muñoz-González, L., Co, K. T., & Lupu, E. C. (2019). Byzantine-robust federated machine learning through adaptive model averaging. *arXiv preprint arXiv:1909.05125*.

XXVIII. Nina M.C. De Jong, Aafke Aartse, Marit J. Van Gils, Dirk Eggink. (2020) Development of broadly reactive influenza vaccines by targeting the conserved regions of the hemagglutinin stem and head domains. Expert Review of Vaccines 19:6, pages 563-577.

XXIX. OIE (2014-2016) World Organisation for Animal Health. World Animal Health Information System. WAHIS Interface. http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.5.05_Gripe_equina.pdf

XXX. Oladunni, F.S.; Oseni, S.O.; Martinez-Sobrido, L.; Chambers, T.M. Equine Influenza Virus and Vaccines. Viruses 2021, 13, 1657. https:// doi.org/10.3390/v13081657

XXXI. Paillot, R., Kydd, J. H., Sindle, T., Hannant, D., Toulemonde, C. E., Audonnet, J. C., ... & Daly, J. M. (2006). Antibody and IFN-γ responses induced by a recombinant canarypox vaccine and challenge infection with equine influenza virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, *112*(3-4), 225-233.

XXXII. Perglione, C. O., Gildea, S., Rimondi, A., Miño, S., Vissani, A., Carossino, M., ... & Barrandeguy, M. (2016). Epidemiological and virological findings during multiple outbreaks of equine influenza in S outh A merica in 2012. *Influenza and other respiratory viruses*, *10*(1), 37-46.

XXXIII. Plata Hipólito, C. B. (2019). Mutaciones en epítopes de neutralización de la proteína M1 del virus influenza de equinos y caninos del estado de Nuevo León (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

XXXIV. Riveros, V., Moreira, R., Zeledón, M. O., & Berríos, P. (1987). Estudio serológico de virus influenza y parainfluenza-3 en pequeños rumiantes del Zoológico Nacional de Santiago. Avances en Ciencias Veterinarias, 2(1).

XXXV. Sguazza, G. H. Producción de Vacunas de 2º Generación a partir de Proteínas Recombinantes.

XXXVI. SENASA 2022. https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadenaanimal/equinos/equinos-produccion-primaria/influenza-equina#:~:text=movimientos%20de%20equinos.-,En%20la%20Argentina%2C%20la%20vacunaci%C3%B3n%20est%C3%A1%20permitida%20y%20es%20obligatoria,ecuestres%20que%20concentren%20%C3%A9quidos%20para

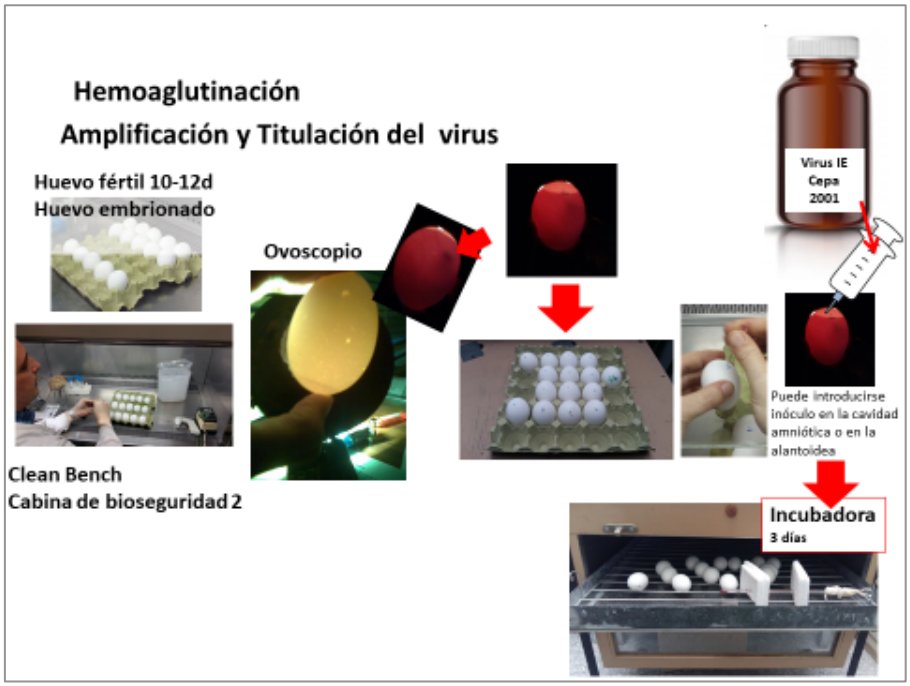
XXXVII. Timoney, P. J. (1996). Equine influenza. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, *19*(3), 205-211

XXXVIII. Townsend, H. G. G., Penner, S. J., Watts, T. C., Cook, A., Bogdan, J., Haines, D. M., ... & Youngner, J. S. (2001). Efficacy of a cold-adapted, intranasal, equine influenza vaccine: challenge trials. *Equine veterinary journal*, *33*(7), 637-643.

XXXIX. Virmani, N., Bera, B. C., Gulati, B. R., Karuppusamy, S., Singh, B. K., Vaid, R. K., ... & Singh, J. (2010). Descriptive epidemiology of equine influenza in India (2008-2009): temporal and spatial trends. *Vet. Ital*, *46*, 449-458.

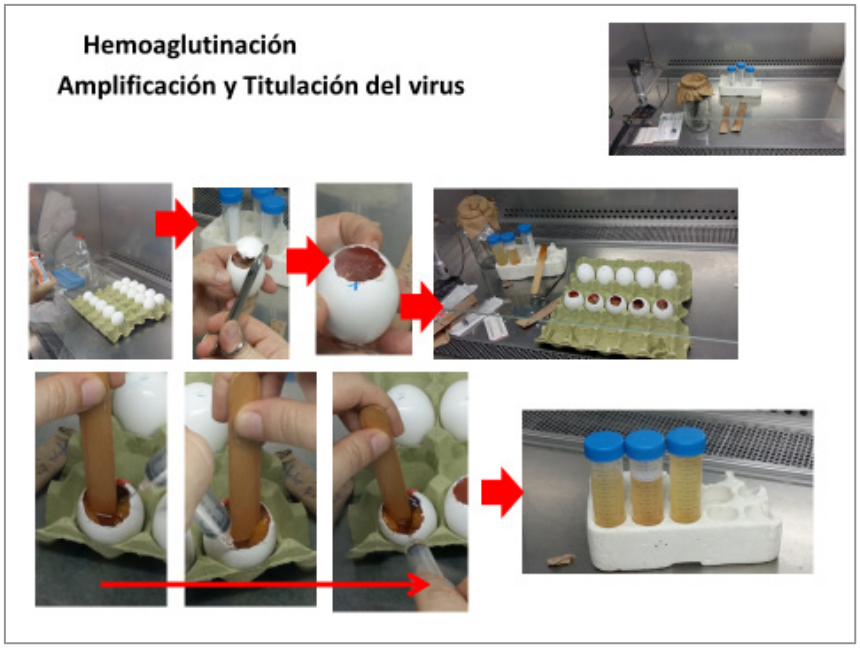
ANEXO I

Gráficos e imágenes tomadas durante la realización de la técnica de HA.



Esquema 1: Amplificación viral

Secuencia de inoculación del virus en cavidad alantoidea de huevo embrionado.



Cosecha

Extracción de líquido alantoideo

Esquema 2: Cosecha viral

Secuencia de extracción de líquido alantoideo.

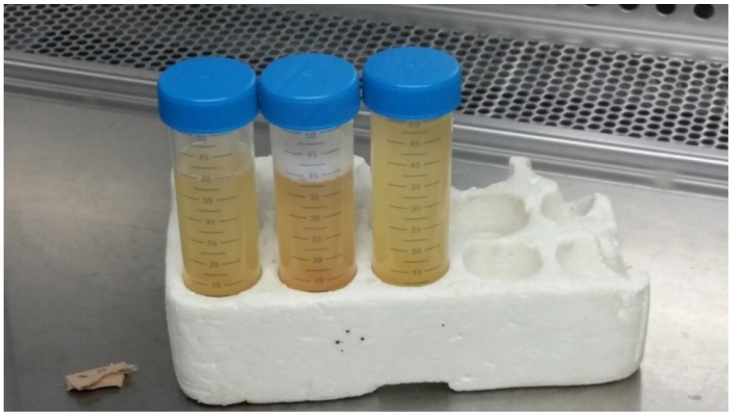


Imagen 1: Stock viral

Virus amplificado listo para ser titulado por HA

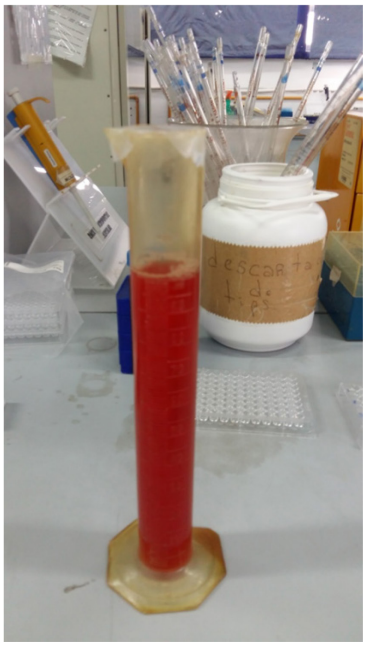


Imagen 2: Glóbulos rojos
100 ml de GR de pollo 0.75% en solución buffer PBS pH 7,2.

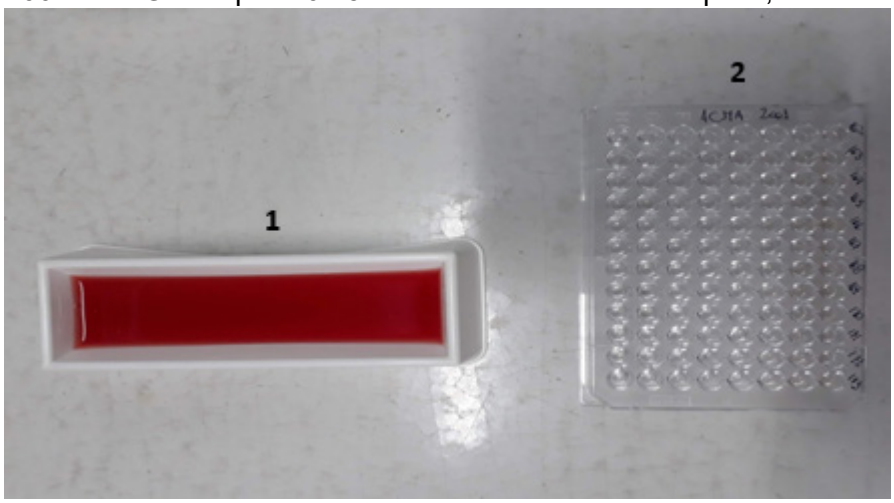
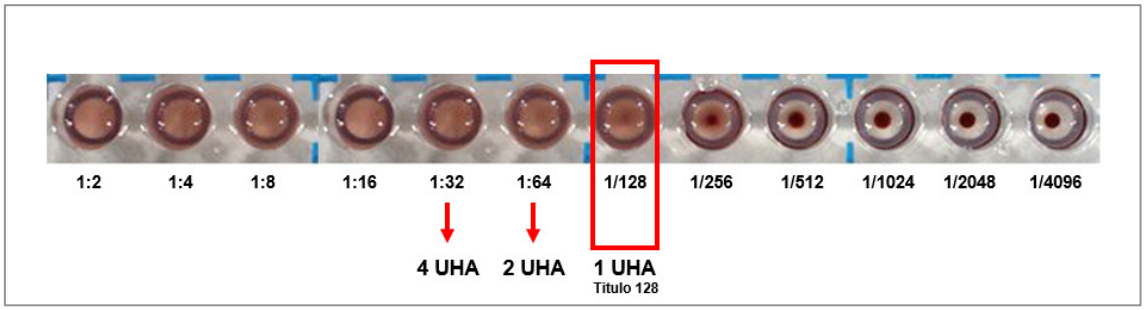


Imagen 3: Elementos para la HA e IHA.
1: Cubeta para dispensar solución de GR 0.75%. 2: placas de 96 pocillos con fondo en V



Esquema 3: Titulación del stock viral por HA

Esquema para graficar la lectura y titulación viral para realizar el cálculo y obtener la dilución que contienen 4 Unidades Hemoaglutinantes (UHA) como dilución del antígeno viral para la realización de la IHA.

ANEXO II

Gráficos e imágenes tomadas durante la realización de la técnica de IHA.

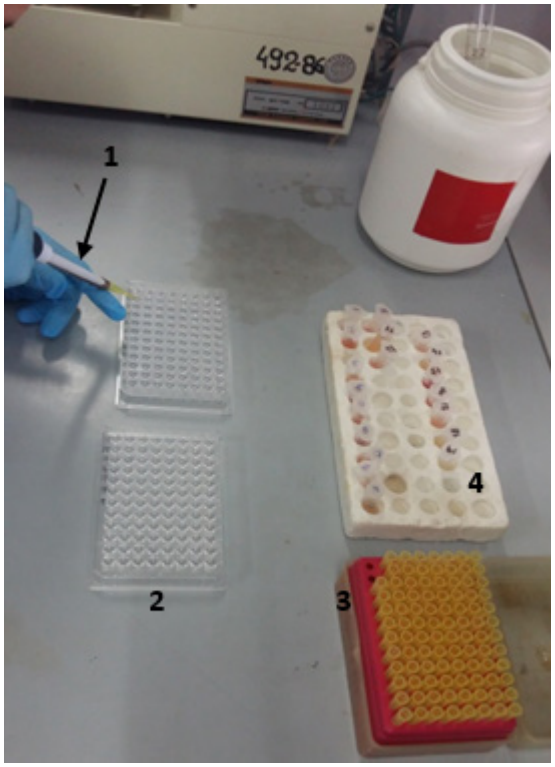


Imagen 4: Elementos para la IHA.

1: micropipetas; 2: placas de 96 pocillos con fondo en V; 3: tips para micropipetas; 4: gradillas con sueros problemas para procesar.

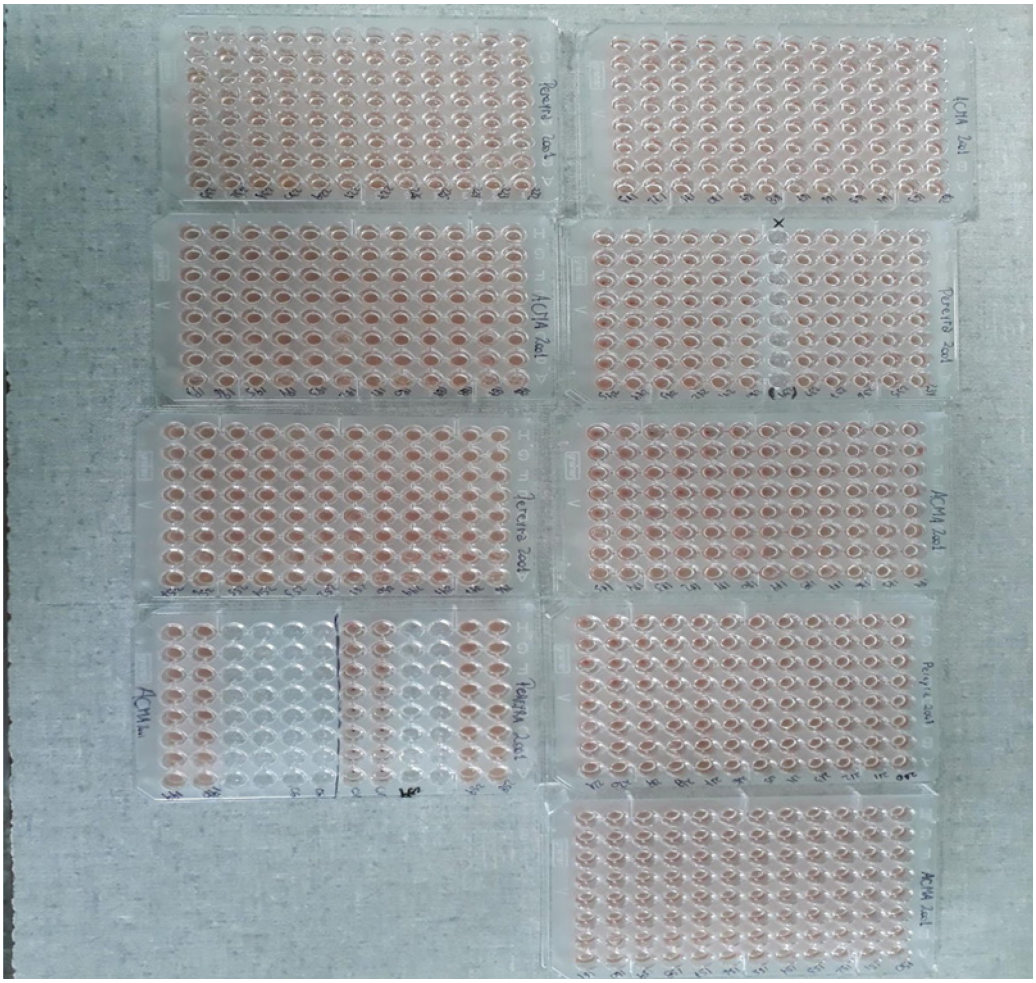


Imagen 5: Placas donde se pueden observar inhibición de la hemoaglutinación.