



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

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

**Evaluación del título de anticuerpos contra  
una cepa de influenza equina del año 2018**

Autor: M.V. Pablo Daniel Ramirez

Director: Dr. Hernán Sguazza

Codirector: Dra. Alejandra Larsen

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

**2022**

## RESUMEN

La influenza equina es una enfermedad respiratoria de origen viral que afecta a los équidos de todo el mundo. Se caracteriza clínicamente por ser de presentación aguda y cursar con signos tales como fiebre, tos seca, secreción nasal, letargia y anorexia. Es altamente contagiosa y, debido a ello, puede comprometer seriamente el movimiento internacional de los caballos. Además es causante de pérdidas económicas en todo el mundo ya que los caballos deportivos que la contraen quedan temporalmente incapacitados, deben dejar el entrenamiento durante semanas y disminuye su performance. En Argentina se notificó un nuevo brote de Influenza A equina en marzo del 2018 en el hipódromo de la provincia de Mendoza. La infección se confirmó mediante RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) y pruebas serológicas. Posteriormente se registraron nuevos casos en establecimientos de San Juan, Chubut, Provincias de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Santa Fe. Estudios epidemiológicos realizados a partir de este brote, demostraron que el virus asociado a estos casos sufrió variaciones antigénicas significativas en comparación con las cepas incluidas en las vacunas más utilizadas en Argentina. Este hecho puede conducir a la pérdida de efectividad de las vacunas que se comercializan actualmente. Dado que se desconoce la protección inmunológica contra la cepa circulante, el objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de anticuerpos contra influenza y el título de los mismos, utilizando para ello el aislamiento más reciente de influenza equina del año 2018, realizado en el Laboratorio de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata.

### **Palabras clave:**

Virus de la gripe equina - Caballos - Anticuerpos - Inhibición de la hemaglutinación

## **ABSTRACT**

Equine influenza is a respiratory disease of viral origin that affects equids worldwide. It is characterized clinically by an acute presentation with signs such as fever, dry cough, nasal discharge, lethargy and anorexia. Due to its high contagiousness, is a disease that can seriously compromise the international movement of horses and causes great economic losses worldwide, because competition horses get sick are temporarily incapacitated, must stop training for weeks and their performance decreases. In Argentina, a new outbreak of Equine Influenza A was reported in March 2018 at the racetrack in the province of Mendoza. Infection was confirmed by real-time RT-PCR (qRT-PCR) and serological testing. Subsequently, new cases were reported in establishments in San Juan, Chubut, Buenos Aires Provinces, Autonomous City of Buenos Aires and Santa Fe. Epidemiological studies carried out after this outbreak showed that the virus associated with these cases underwent significant antigenic variations compared to the strains included in the most widely used vaccines in Argentina. This fact may lead to the loss of effectiveness of the vaccines currently marketed. Since the immunological protection against the circulating strain is unknown, the aim of this work was to evaluate the presence and titer of antibodies against influenza, using for this purpose the most recent equine influenza isolate of 2018, performed at the Laboratory of virology of the Faculty of Veterinary Science of National University of La Plata.

### **Keywords:**

Equine influenza virus - Horses - Antibodies - Hemagglutination inhibition

# INTRODUCCION

## Etiología

La Influenza Equina (IE) es una enfermedad clínica que afecta a caballos, asnos y mulas y hoy en día es considerada como la mayor causa de enfermedades respiratorias en équidos en todo el mundo.

El agente causal es un virus taxonómicamente ubicado dentro de la familia *Orthomyxoviridae*, género Influenza tipo A (Timoney, 1996). El Virus de Influenza equina (EIV, por su sigla en inglés de Equine Influenza Virus), se considera como el antepasado de todos los demás virus de influenza de especies de mamíferos y no mamíferos (Screenivasan, 2015).

La partícula viral posee un diámetro que oscila entre los 80-120 nm, es pleomórfica y envuelta. Los virus de la influenza A poseen ocho cadenas de ARN en sentido negativo, el genoma viral codifica proteínas estructurales que se denominan hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), y nucleoproteína (NP). También codifica dos proteínas de matriz (M1 y M2), tres polimerasas virales (PB1, PB2 y PA), una proteína de exportación nuclear (NEP) y una proteína no estructural denominada NS1. Las glicoproteínas HA y NA forman el 45% de la envoltura viral y se consideran dos elementos esenciales para la entrada a la célula hospedadora y liberación viral (Singh, 2018).

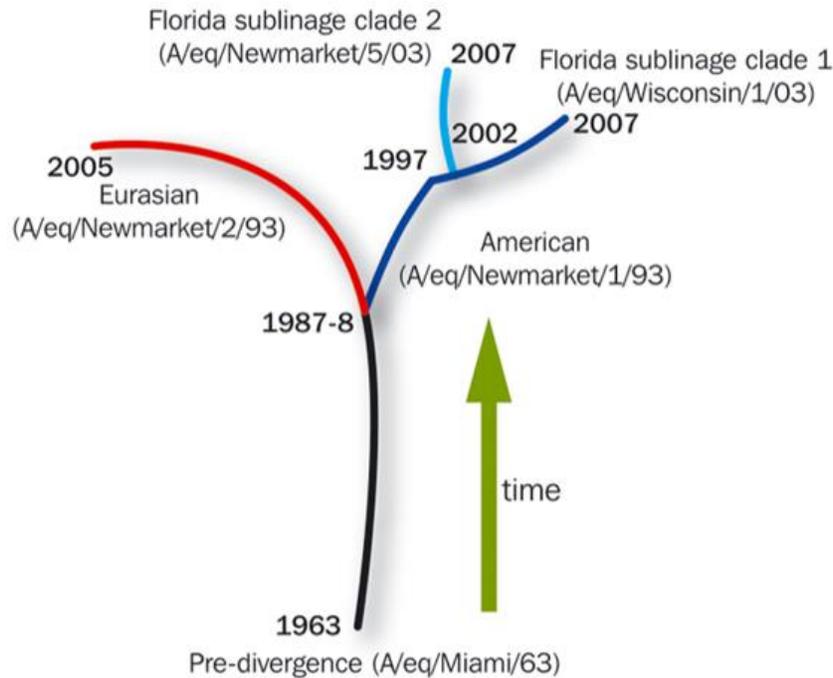
Las proteínas HA y NA son los antígenos de superficie de relevancia en la respuesta inmune humoral ya que los anticuerpos generados contra las mismas proporcionan resistencia a la infección (Landolt, 2014). Los anticuerpos neutralizantes generados contra la HA son los responsables de bloquear la entrada del virus; por lo tanto, las variaciones antigénicas en esta molécula pueden conducir al fracaso de la vacuna (Yates & Mumford, 2000). Del mismo modo, los anticuerpos protectores contra NA adhieren al virus a la superficie de la célula huésped e impiden la liberación de la partícula viral (Sylte & Suárez, 2009). La inmunidad heterotípica se proporciona por las respuestas humorales; mientras que la respuesta de reacción cruzada (mediada por linfocitos T citotóxicos) se observa entre los subtipos virales, aplicado a todos los subtipos de virus tipo A (Hemann et

al., 2013; McKinstry et al., 2013; Landolt, 2014). En este sentido, cambios sutiles en la constitución de aminoácidos de la HA y la NA pueden dar lugar a un escape inmune debido a la diferente antigenicidad (Park et al., 2009). Cabe destacar que la diversidad genética del virus de influenza equina está favorecida por la estructura segmentada de su genoma y la capacidad de multiplicarse en muchas especies animales. Por un lado, la acumulación de mutaciones puntuales en cada ciclo replicativo se refleja en pequeños cambios en las proteínas virales (drift antigénico) y, las variaciones de mayor importancia de estos virus, se producen por reordenamiento del genoma viral durante el proceso denominado shift antigénico. Esto ocurre cuando una misma célula es infectada simultáneamente por dos virus diferentes, los viriones resultantes pueden contener mezclas de los genes de los virus parenterales produciendo nuevas cepas con composiciones genéticas muy diferentes y generar una falla en la vacunación, dando lugar a grandes epizootias (Sguazza, 2022).

A la vez, el análisis de la estructura y la composición antigénica de estas dos glicoproteínas permiten subtipificar a los virus de este género (Webby et al., 2007; Cullinane & Newton, 2013; Lewis et al., 2014). Hasta la fecha solo se han descrito dos subtipos capaces de infectar a équidos: H7N7 y H3N8, anteriormente denominados virus equinos 1 y 2, respectivamente (Daly et al., 2011; Chambers, 2014; Sreenivasan et al., 2018). El subtipo H7N7 se considera extinto por lo que, en la actualidad, todos los brotes de Influenza equina son causados por H3N8.

El subtipo H3N8 se aisló por primera vez en 1963 de caballos que manifestaron los síntomas de influenza en la ciudad de Miami (Waddel et al., 1963). Con el transcurso del tiempo el subtipo H3N8 evolucionó en dos linajes genéticos distintos: Americano y Euroasiático (Daly et al., 1996). Posteriormente, el linaje Americano evolucionó en tres sublinajes denominados: Sudamericano, Kentucky y Florida (Lai et al., 2001). Más recientemente el sublinaje Florida evolucionó dando lugar a la aparición de dos grupos de virus con secuencias divergentes en la estructura de la HA que se denominan Clado 1 y 2 (Bryant et al., 2011). Actualmente, los virus de los Clados 1 y 2 circulan por todo el mundo dando lugar a distintos brotes sin importar las barreras geográficas (Figura 1).

Los virus del Clado 1 han estado circulando más en el continente americano, aunque también han sido responsables de brotes importantes en Japón y Australia (Bryant et al., 2009). Los virus del Clado 2 han ocasionado la mayoría de los brotes en Europa y Asia, especialmente en China, India y Mongolia (Virmani et al., 2010).



**Figura 1: Evolución del virus de la influenza equina (H3N8).** Extraído de: Evolving threat of equine 'flu: how best to deal with menace (Paillot et al., 2008)

## Transmisión

La transmisión del virus ocurre por inhalación a través de aerosoles que pueden propagarse efectivamente a través del aire hasta 1–2 km de distancia. La transmisión de caballo a caballo es más rápida en comparación con otras infecciones respiratorias en la especie equina (Chambers, 2014). El comercio internacional, las actividades hípcas y el tráfico asociado a las mismas favorecen a la propagación de la enfermedad. El virus puede permanecer 3 días en el medio ambiente, lo que provoca la propagación en otros animales a través de fómites. El período de incubación es de 1 a 3 días y se ha descubierto que los caballos

infectados eliminan, a través de las descargas nasales, el virus hasta 10 días post infección (Daly et al., 2004).

Al ser una enfermedad contagiosa, la tasa de infección por EIV es casi del 100% en los caballos no vacunados. Los equinos de 1 a 5 años son más susceptibles a contraer la infección. El estado inmune de los animales juega un papel importante en el inicio de la enfermedad. Dentro de un plantel de animales vacunados generalmente hay una pequeña proporción que responde con bajos niveles de anticuerpos y que juegan un papel importante en la diseminación de la infección, ya que pueden enfermarse de manera subclínica y diseminar el virus. Estos animales deben ser identificados por pruebas serológicas y revacunados para que alcancen un nivel de anticuerpos protectores y así mantener a todos los animales protegidos.

La prevención depende fundamentalmente de la vacunación y de la aplicación de programas de manejo que reduzcan la exposición de caballos susceptibles al virus, como por ejemplo la implementación de períodos de cuarentena adecuados antes y después de la movilización de animales. No obstante, es necesario establecer regímenes de desinfección regular de los vehículos de transporte, las caballerizas, el material de trabajo y la ropa del personal a cargo. Durante un brote de la enfermedad, se debe intentar reducir la transmisión de virus aislando a los animales afectados durante 3 o 4 semanas (Sguazza, 2022).

### **Presentación clínica de influenza equina**

El período de incubación generalmente depende del estado inmune de los animales, varía de 18 horas hasta 5 días en entornos experimentales. El síndrome febril puede durar de 2 a 3 días.

La signología clínica incluye signos generales tales como pérdida de apetito, debilidad, bajo rendimiento, adenomegalia, hipertermia de 39,4 a 41,1° C (de 2 a 3 días). Los signos de enfermedad respiratoria incluyen tos áspera y seca, disnea, hiperemia de mucosa nasal y conjuntival y presencia de secreción nasal serosa que puede volverse amarillenta debido a infección bacteriana secundaria. Otros signos

asociados a esta enfermedad son rigidez en piernas debido a edema de extremidades y dolor muscular y aborto por hipertermia (Singh, 2018).

Los equinos inmunizados suelen cursar la enfermedad como una infección subclínica, por lo que puede pasar desapercibida.

La recuperación se concreta al transcurrir 1-2 semanas, mientras los animales gravemente enfermos requieren un mes para recuperarse (Cullinane & Newton, 2013).

La tasa de morbilidad es alta mientras que la tasa de mortalidad es baja. La muerte generalmente ocurre debido a la neumonía como secuela y, en casos raros, puede producirse como consecuencia de una miocarditis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, especialmente cuando los caballos vuelven de entrenar demasiado pronto (Cullinane & Newton, 2013).

No existe un tratamiento específico, pero se aconseja el descanso absoluto hasta una semana después que los signos hayan desaparecido, en caballos de competición se recomienda una semana de reposo por cada día de fiebre. Algunas veces es conveniente la administración de antiinflamatorios no esteroides, también es aconsejable la administración de vitamina C y soluciones electrolíticas balanceadas. Los corticoides y antitusígenos están contraindicados ya que la tos colabora en la limpieza de las vías respiratorias (Singh, 2018).

## **Patogenia**

El virus daña principalmente las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio anterior y posterior, lo que provoca la incapacidad para eliminar sustancias extrañas. Al comienzo de la infección, la glicoproteína HA, se adhiere a los receptores localizados en la superficie de la célula huésped y la partícula viral entra a la célula por endocitosis e ingresa al núcleo a través del citoplasma de la célula huésped. Una vez dentro del núcleo, las ARN polimerasas (PB1, PB2 y PA) inician la síntesis de los ARNs mensajeros virales y utiliza la maquinaria de la célula huésped para la producción de sus proteínas (Singh, 2018). Al ser un virus envuelto, sale de la célula huésped mediante gemación (Radostits et al., 2003).

La replicación del virus conduce a la liberación de partículas virales de una célula infectada que ingresan a otras células, lo que daña el tracto respiratorio y conduce a la necrosis de las células epiteliales respiratorias, exudación de líquido rico en proteínas en las vías respiratorias, agrupación de los cilios y deterioro progresivo del aparato ciliar.

Debido a la acumulación de líquido en el tracto respiratorio, hay posibilidades de infección bacteriana secundaria y organismos como *Streptococcus equi* var. *Zooepidemicus* producen inflamación que conduce a la bronconeumonía (Radostits et al., 2003).

La eliminación viral puede observarse durante un período de 7 a 10 días, mientras que el genoma viral (ARN) puede detectarse durante 15 días o más mediante PCR (Chambers, 2014).

Las células infectadas sufren apoptosis debida a la activación y escisión de caspasas esenciales para la citotoxicidad causada por el virus (Lin et al., 2002). La proteína no estructural 1 (NS1) de EIV es fundamental en la patogénesis de la enfermedad, muchas veces las diferencias observadas en la presentación de la enfermedad se deben a la variación de esta proteína (Elton & Bryant, 2011). La proteína NS1 facilita la replicación del virus y tiene un efecto inhibitorio sobre las estrategias antivirales aplicadas por el huésped. Esto comprende las propiedades para inhibir la maquinaria de procesamiento de ARN del huésped y utilizar estos componentes de las células para la transcripción del ARN viral; la inhibición del factor regulador de interferón 3 (IRF-3), NF-κB y otros factores de transcripción necesarios para combatir la infección (Barba & Daly, 2016). La respuesta de células T citotóxicas se genera contra M, NP y PB2, lo que ayuda en la eliminación viral (Landolt, 2014).

## **Diagnóstico**

En las poblaciones sin vacunar, la aparición de fiebre, tos seca y la rápida diseminación suelen ser un diagnóstico casi inequívoco de influenza. En caballos vacunados en los que el cuadro clínico es menos evidente algunos de los síntomas pueden confundirse con los causados por otros agentes como los herpesvirus

equino 1 y 4, virus de la arteritis viral, adenovirus, rinovirus, *Streptococcus equi*, *S. zooepidemicus* y *S. pneumoniae*, entre otros. Por lo tanto, en estos casos el diagnóstico presuntivo debe ser confirmado en el laboratorio por medio de la detección o el aislamiento del virus, o por pruebas serológicas (Chambers et al., 1995).

Existe una variedad de técnicas de diagnóstico disponibles para la infección por influenza equina. Se pueden mencionar técnicas directas tales como el aislamiento de virus, detección del antígeno a través del ARN genómico y técnicas indirectas que corresponden a ensayos serológicos (Mumford, 1990; Chambers et al., 1994; Gupta et al., 2003; Cullinane et al., 2006; Landolt et al., 2007; OIE, 2008; Cullinane y Newton, 2013; Kapoor y Dhama, 2014).

Para el diagnóstico directo, se utilizan muestras a partir de hisopados de la región nasofaríngea inmediatamente después del inicio de los síntomas clínicos, es decir, dentro de los tres a cinco días. El hisopado nasofaríngeo contiene más concentración de virus que los hisopos nasales (Chambers & Reedy, 2014). El transporte de las muestras en contenedores apropiados con hielo es esencial. Si las muestras se van a transportar durante más de 2 días, deben mantenerse a  $-60^{\circ}\text{C}$  o a temperaturas más bajas.

El aislamiento viral generalmente se realiza en embriones de pollo 9 a 11 días, que son inoculados en la cavidad alantoidea o amniótica y se incuban a  $35^{\circ}\text{C}$  durante tres días. Luego, la presencia del virus en el líquido alantoideo o amniótico recogido es analizado por medio de la prueba de aglutinación de glóbulos rojos (HA). También se puede emplear qRT-PCR para la detección rápida del virus a partir de la muestra tomada con el hisopo (Gora et al., 2017). Aunque el diagnóstico mediante el aislamiento del virus es lento, resulta indispensable si se desea obtener y analizar la cepa causante.

La seroconversión también se puede emplear para el diagnóstico de la enfermedad y se usan comúnmente ensayos como la inhibición de la hemaglutinación (HI), hemólisis radial simple (SRH), inmunodifusión radial simple (SRID) e inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA) (OIE, 2008).

## **Vigilancia epidemiológica**

La principal forma de control es la vacunación obligatoria de equinos, la aplicación de programas de manejo que reduzcan la exposición de caballos susceptibles al virus y el cumplimiento de períodos de cuarentena adecuados antes y después de la movilización de animales. Es recomendable la vacunación anual de los equinos adultos aunque, de acuerdo a la reglamentación establecida por el SENASA, para los equinos de competición es obligatoria la revacunación cada tres meses con el fin de mantener una protección elevada. Durante un brote de la enfermedad, se debe aislar a los animales afectados, durante 3-4 semanas, para reducir la transmisión de virus. Dentro de un plantel de animales vacunados, generalmente hay una pequeña proporción que responde con bajos niveles de anticuerpos y que juegan un papel importante en la diseminación de la infección ya que pueden enfermarse de manera subclínica y eliminar el virus. Estos animales deben ser identificados por pruebas serológicas y revacunados para que alcancen un buen nivel de anticuerpos protectores y así mantener a todos los animales protegidos (Sguazza et al., 2022).

Sin embargo, debido a la variabilidad antigénica de las cepas del virus en circulación y la dificultad de combinar la cepa de la vacuna con las cepas de virus circulantes, la vacunación no siempre previene la infección, aunque puede reducir la gravedad de la enfermedad y acelerar tiempos de recuperación. Por lo tanto, también es importante realizar el estudio etiológico de las cepas causantes de los brotes para comprobar si hay cambios antigénicos en el virus circulante y si es necesario reformular las vacunas empleadas (Junior, 2018).

Las vacunas se producen de acuerdo con las pautas del Manual de prueba de evaluación diagnóstica (OIE, 2008). Existen varias vacunas comerciales inactivadas que contienen cepas representativas de los dos subtipos circulantes del virus. Estas vacunas dan una buena protección contra virus H7N7, pero la protección contra el H3N8 suele ser menos eficaz (Powell et al., 1977). Debido a la muy baja o nula circulación del subtipo H7N7 el comité de vigilancia epidemiológica de la OIE ha recomendado no incluir este subtipo en la formulación de nuevas vacunas, pero sí recomienda incluir al menos un representante de cada uno de los

linajes del subtipo H3N8 en la formulación de la vacuna contra el virus (Daly et al., 2004).

Los virus equinos son genéticamente más estables que los virus de la gripe humana, pero la deriva antigénica del H3N8 influye en la eficacia de la vacuna (Newton et al., 2006). Por otro lado, aunque los títulos de IgG alcanzados mediante la vacunación son adecuados, por lo general las vacunas inactivadas no inducen un título de IgA suficientemente protector en las secreciones respiratorias, que constituyen la primera barrera para evitar la infección. Los caballos que han sido infectados naturalmente obtienen una inmunidad capaz de protegerlos de una reinfección por períodos de un año o más (Hannant et al., 1988). Sin embargo, la inmunización conseguida con las vacunas inactivadas comúnmente disponibles en el mercado induce una respuesta inmune con una vida media muy baja, cuantitativamente menor a la inmunidad obtenida luego de la infección natural con el virus (Nelson et al., 1998) y frecuentemente no protectora.

### **Antecedentes de la enfermedad en Argentina**

En Argentina el subtipo 1 (H7N7) fue detectado por primera vez en el año 1976, pero no se ha vuelto a aislar desde la década del '80. Mientras que el subtipo 2 (H3N8) fue aislado en 1985 durante una gran epizootia de esta enfermedad ocurrida en nuestro país (Nosetto et al., 1989).

Posteriormente, en marzo de 1993, se produjo un brote de influenza equina (IE) en los hipódromos de Palermo y de San Isidro, donde enfermaron aproximadamente el 40 % de los equinos en entrenamiento. En octubre de 1994, otro episodio de intensidad menor afectó a los animales de dos años de edad. A fines de mayo de 1995, se notificó otro brote en el hipódromo de San Isidro, con la particularidad de haber afectado en forma variable a los equinos, lo que se atribuyó a los diferentes estados inmunitarios dentro de una población. En el periodo comprendido entre 2011 y 2016, en el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) se recibieron 19 notificaciones de sospechas de IE, con 12 eventos confirmados de la enfermedad y 238 equinos afectados. El último brote confirmado de IE en la Argentina se produjo en 2012, afectó principalmente a los

hipódromos de la provincia de Buenos Aires (Azul, La Plata y San Isidro) y de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Palermo) (Durante, 2017). La misma cepa causante del brote de 2012 fue aislada en 2015, durante los brotes de IE y casos individuales notificados en China, Francia, Alemania, Irlanda, Malasia, Suecia, Reino Unido y Estados Unidos (OIE, 2016).

### **Descripción del brote del año 2018 en Argentina**

Olguín Perglione y colaboradores (2019) describen que, entre el 23 de marzo y el 10 de julio, la enfermedad se observó clínicamente en caballos pertenecientes a distintos establecimientos con distancias geográficas significativas entre sí. Se presentó tanto en equinos pura sangre de carrera como en otros que participaban en actividades de salto y polo. El virus se detectó por primera vez en un hipódromo en la provincia de Mendoza, el 23 de marzo, donde el setenta por ciento de los caballos fueron clínicamente afectados.

Entre el 31 de marzo y el 12 de abril, se observaron casos clínicos en los hipódromos de San Isidro (Provincia de Buenos Aires) y Palermo (Ciudad Autónoma de Buenos Aires). Según los datos reportados por los veterinarios de las instalaciones, la morbilidad de la enfermedad fue del 70% en Palermo y 10% en San Isidro.

Del 11 de abril al 2 de mayo, se observaron casos clínicos en caballos de polo pertenecientes a tres establecimientos diferentes de la Provincia de Buenos Aires, ubicados en Capilla del Señor, Pilar y Hurlingham.

Entre el 27 de abril y el 10 de julio, caballos de salto de cinco clubes ubicados en los alrededores de Tandil, Pilar y San Miguel, en Provincia de Buenos Aires, fueron afectados. En uno de estos clubes de saltos, la morbilidad alcanzó el 48% por ciento. Además, SENASA informó casos clínicos compatibles con la IE en otros cuatro hipódromos, ubicados en La Ciudad de Plata (provincia de Buenos Aires), provincias de Chubut, Santa Fe y caballos del ejército en la provincia de San Juan. (Olguín Perglione, 2019)

Los animales clínicamente afectados variaron entre uno y seis años de edad. Los signos clínicos se caracterizaron por pirexia, tos y secreción nasal, inicialmente

serosa y luego mucopurulenta. El 39% de los caballos afectados no estaban vacunados o no tenían un historial de vacunación actualizado. El 61% restante, habían recibido al menos una dosis de vacuna en los tres meses anteriores. Cabe destacar que, dentro del grupo inmunizado, el 76% habían sido inmunizados con una vacuna comercial que contenía la cepa americana (A/eq/Kentucky/1997) y el 24% restante con una vacuna que contiene cepas actualizadas (Florida Clado 1, A/eq/Argentina/E2345-1/2012 y Florida Clado 2, A/eq/Meath/07).

El análisis filogenético realizado posteriormente, demostró que la secuencia de aminoácidos de las cepas que estuvieron circulando en Argentina en el año 2018 presentan un 100% de homología en la identidad de sus secuencias con respecto a la cepa detectada en Chile en enero de 2018, en Escocia en febrero de 2018 y un 99% de identidad con las cepas aisladas en Japón en el año 2017 y EE. UU en el 2016.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la presencia y el título de anticuerpos contra influenza en dos poblaciones equinas (vacunados y no vacunados), utilizando para ello el aislamiento más reciente de EIV (año 2018) realizado en el Laboratorio de Virología (LAVIR) - FCV -UNLP.

## **HIPÓTESIS**

Los equinos vacunados no poseen título de anticuerpos protectivos contra la cepa de Influenza equina que causó el brote del año 2018.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Toma de muestras de suero**

Para medir la prevalencia de anticuerpos, se analizaron dos poblaciones equinas: 50 sueros de equinos vacunados anualmente contra influenza, provenientes de la ONG “Ayuda a Caballos Maltratados” (ACMA), de Alejandro Korn, provincia de Buenos Aires y 50 sueros de animales no vacunados de distintas áreas de la provincia de Buenos Aires.

Se extrajo sangre de cada animal, mediante punción de la vena yugular utilizando jeringas de 10cm<sup>3</sup>, la sangre se dejó coagular durante 30 – 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se separó el suero de cada muestra y se traspasó a un tubo plástico estéril. Los 100 sueros fueron almacenados a -20°C hasta su análisis.

### **Pasaje del virus en huevos embrionados**

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó como antígeno una cepa del virus de influenza equina previamente aislada en el Laboratorio de Virología FCV-UNLP en el año 2018 durante el brote de influenza equina(IE) ocurrido durante ese mismo año. Con el fin de aumentar el título viral de esta muestra, se realizó un pasaje en huevos embrionados de 10 días. Inicialmente se realizó una dilución 1/5 de la muestra en PBS estéril con el agregado de antibióticos (Penicilina – Estreptomina: 100U/ml y 100µg/ml respectivamente), luego se inoculó la cavidad alantoidea de 6 huevos embrionados, utilizando 150µl de la dilución en cada uno. Una vez inoculados los huevos, fueron incubados a 37°C durante tres días (para permitir la replicación del virus). Transcurrido el tiempo de incubación, se los colocó a 4°C durante 6 horas y luego se extrajo el líquido alantoideo en forma estéril, por medio de una jeringa, obteniéndose en total 45 ml de líquido alantoideo, que luego fue clarificado por centrifugación a 5.000 rpm durante 15 minutos. Finalmente, el líquido alantoideo fue fraccionado en tubos plásticos estériles de 2 ml y conservado a -70°C hasta su uso.

### **Obtención de glóbulos rojos de pollo**

Para la obtención de glóbulos rojos (GR), se realizó una extracción con jeringa de 5cm<sup>3</sup> de sangre de pollo por punción de la vena radial. La sangre obtenida, fue inmediatamente traspasada a un tubo Falcon conteniendo 25ml 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 con 25ml de PBS. Posteriormente, se realizaron dos lavados más con las mismas condiciones descriptas. Una vez realizados los tres lavados los GR fueron diluidos en PBS para obtener una concentración final de 0.75% (750µl de GR más 99.25ml de PBS). La solución de GR así obtenida fue almacenada a 4°C hasta su posterior uso en las técnicas de Hemaglutinación e Inhibición de la hemaglutinación.

### **Test de Hemaglutinación (HA)**

Para cuantificar el título viral, se realizó un test de HA utilizando el líquido alantoideo previamente obtenido y la muestra original como control, con el fin de determinar si hubo un aumento cuantificable en el título del virus luego de la inoculación en huevos embrionados. Ambas muestras fueron procesadas por duplicado de la siguiente manera:

En una placa de 96 pocillos (con fondo en V), se colocaron 100µl de muestra en el primer pocillo de una fila y 50µl de PBS en los pocillos restante de la fila, luego se hicieron diluciones seriadas en base dos trasvasando 50µl del primer pocillo al segundo y así sucesivamente hasta el anteúltimo pocillo. Una vez que se realizaron las diluciones en cada uno de los pocillos, se colocaron 50µl de una solución al 0.75% de GR de pollo en PBS en todos los pocillos. El último pocillo, que no fue empleado para hacer las diluciones del virus (conteniendo solamente los 50µl de PBS originales) fue utilizado como control de los GR. Después de homogeneizar suavemente la placa, se la dejó sobre una superficie lisa a temperatura ambiente durante 45 minutos. El título hemaglutinante de la muestra del stock viral se definió como la inversa de la máxima dilución donde se observó aglutinación de los glóbulos rojos y es una medida indirecta de la cantidad de partículas virales.

Una vez titulado el antígeno viral, fue diluido en PBS de manera tal de obtener una concentración final de 4 unidades hemaglutinantes (UHA) e inmediatamente utilizado para medir la cantidad de anticuerpos en los sueros problema mediante el test de inhibición de la hemaglutinación.

### **Test de inhibición de la hemaglutinación (HI)**

El título de anticuerpos contra el virus fue cuantificado por el test de HI en placas de 96 pocillos con fondo en V. Antes de ser utilizados para la HI, los sueros fueron descomplementados a 56°C durante 30 minutos en baño térmico.

Inicialmente se colocaron 50µl de cada uno de los sueros en la primera columna de la placa (cada suero fue analizado por duplicado). A continuación, se agregaron 25µl de PBS en los pocillos restantes de la placa y luego se realizaron diluciones seriadas (en base 2) trasvasando 25µl de suero desde la primera columna hasta la última con una micropipeta multicanal (descartando los 25µl sobrantes al llegar a la última columna). Luego, se agregaron 25µl de una suspensión viral con un título de 4UHA, previamente confirmado por el test de HA, como se detalló anteriormente. Posteriormente se homogeneizaron suavemente las placas y se las dejaron tapadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por último, se colocaron 50µl de la solución de GR de pollo al 0,75% en todas las placas, se agitó suavemente cada placa y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos.

Los títulos obtenidos permitieron clasificar a los equinos en protegidos (título igual o mayor 1/128), parcialmente protegidos (títulos 1/16, 1/32 y 1/64) y no protegidos (título igual o menor a 1/8).

Los resultados obtenidos para cada uno de los grupos, fueron analizados estadísticamente con el fin de hallar diferencias significativas entre los distintos grupos de animales (vacunados y no vacunados), utilizando el programa STATGRAPHICS Centurión XV versión 15.2.05 (Statpoint Inc. 2007). Inicialmente se realizó una transformación logarítmica de los datos y se comprobó que no existiera una diferencia significativa entre las desviaciones estándar de cada grupo por el test de Levene con un nivel de confianza del 95,0%. Luego los datos fueron analizados por ANOVA de una vía con un de 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.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Pasaje del virus en huevos embrionados**

Luego de realizar el pasaje de la muestra viral por huevos embrionados, el título obtenido fue 1/32. El cual fue ajustado mediante dilución con PBS hasta obtener una concentración de 4 unidades hemoaglutinantes, para su posterior uso como antígeno en el test de hemaglutinación

### **Test de inhibición de la hemaglutinación (HI)**

Los resultados obtenidos para ambas poblaciones de equinos se presentan en las tablas 1 y 2:

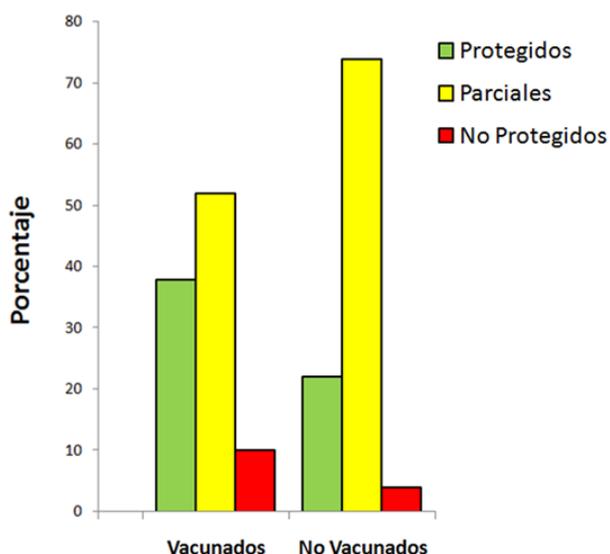
**Tabla 1:** Titulo de anticuerpos contra influenza equina obtenido a partir de muestras de suero y analizadas mediante el Test de inhibición de la hemaglutinación (HI)

<b>Equinos vacunados</b>				<b>Equinos no vacunados</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Titulo (HI)</b>	<b>Muestra</b>	<b>Titulo (HI)</b>	<b>Muestra</b>	<b>Titulo (HI)</b>	<b>Muestra</b>	<b>Titulo (HI)</b>
1	8	26	16	1	256	26	32
2	256	27	4	2	256	27	16
3	64	28	256	3	256	28	64
4	128	29	64	4	16	29	16
5	64	30	64	5	128	30	32
6	32	31	128	6	64	31	64
7	64	32	128	7	32	32	32
8	64	33	64	8	64	33	256
9	64	34	256	9	64	34	16
10	256	35	16	10	64	35	64
11	128	36	32	11	64	36	64
12	32	37	32	12	64	37	32
13	64	38	16	13	64	38	32
14	32	39	128	14	128	39	32
15	4	40	32	15	8	40	64
16	16	41	64	16	8	41	32
17	32	42	256	17	64	42	256
18	8	43	16	18	16	43	32
19	128	44	64	19	32	44	64
20	512	45	64	20	64	45	128
21	128	46	256	21	256	46	16
22	256	47	128	22	256	47	64
23	256	48	32	23	256	48	64
24	32	49	32	24	32	49	16
25	512	50	8	25	64	50	64

**Tabla 2:** Nivel de protección contra el virus de influenza equina, obtenidos en cada una de las poblaciones analizadas mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI)

	No protegidos (HI < 8)	Parcialmente protegidos	Protegidos (HI > 128)
<b>Vacunados</b>	5	27	18
<b>No Vacunados</b>	2	37	11

En el establecimiento donde se vacunó de acuerdo al calendario sugerido por SENASA (trimestralmente), el 36% de los equinos fueron considerados como protegidos contra la cepa del año 2018, en contraposición con el grupo de animales no vacunados, donde se consideró un 22% como protegidos (Figura 2). Los resultados obtenidos no permiten deducir si los títulos de anticuerpos presentes en los animales protegidos de este último grupo se debieron a la presencia de anticuerpos por una infección natural.



**Figura 2:** Porcentaje de animales protegidos (total o parcialmente) y no protegidos contra influenza equina

Si bien se esperarían mayores porcentajes de animales clasificados como protegidos dentro del grupo de equinos vacunados, es importante señalar que solamente un 24% de los caballos infectados durante el brote 2018 habían sido vacunados 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). 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 HI.

De forma inesperada, el 54% y 74% de equinos vacunados y no vacunados respectivamente, fueron considerados como parcialmente protegidos, superando en gran medida al porcentaje de equinos protegidos. El mayor porcentaje de animales con títulos de anticuerpos compatibles con una protección parcial podría deberse a un fenómeno de escape inmunológico, siendo este grupo más susceptible ante a un posible ingreso del agente. Una posible explicación de ese hecho se relacionaría con el uso de vacunas que contienen cepas de EIV caducadas. Dado que la eficacia de las vacunas se basa en la relación antigénica entre la vacuna y las cepas de campo circulantes, las variaciones antigénicas estudiadas en los genes HA y NA, podrían provocar cambios de aminoácidos en las respectivas proteínas, afectando así la antigenicidad del virus (Olguín Perglione, 2019).

Según los antecedentes registrados durante el brote de IE en Argentina, el 76% de los equinos vacunados afectados, fueron inmunizados con una vacuna que contenía la antigua cepa *A/eq/Kentucky/1997*, que es filogenéticamente distante de las cepas del EIV 2018 de Argentina (Resolución SENASA 521/2016). El análisis de las secuencias de aminoácidos de HA mostró que entre *A/eq/Kentucky/97* y las cepas que circulan actualmente, existen 16 sustituciones de aminoácidos, cinco de ellas ubicadas en sitios antigénicos, dos en el sitio antigénico B y tres en el sitio antigénico E. Estas sustituciones

de aminoácidos son críticas, especialmente aquellas ubicadas en el sitio antigénico B en la parte superior de la molécula HA1; ya que cualquier cambio de aminoácido podría comprometer la antigenicidad viral y, en consecuencia, la eficacia de la vacuna. (Woodward, 2015)

Además, existe evidencia científica de que la cepa americana A/eq/Kentucky/97 se encuentra en un grupo antigénicamente distinto de las cepas del Clado 1 de Florida que circulan actualmente (Lewis, 2009).

Por este motivo, sería esperable que los equinos inmunizados con una vacuna que contenía la antigua cepa A/eq/Kentucky/1997, evidencien títulos de anticuerpos compatibles con una protección parcial.

### **Análisis estadístico**

Debido a que los resultados numéricos obtenidos por el test de HI no corresponden a datos continuos y la desviación estándar entre grupos no es la misma (un requisito fundamental para el análisis de varianza), se realizó una transformación logarítmica (en base 10) de los datos con el fin de normalizarlos. Para demostrar que la desviación estándar de los valores de  $\text{Log}_{10}$  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  $\text{Log}_{10}$  (HI) por grupo (Tabla 3):

**Tabla 3:** Análisis de Varianza (ANOVA) para  $\text{Log}_{10}$  de UHI por grupos (equinos vacunados y no vacunados) equinos

<b>GRUPOS</b>	<b>Vacunados</b>	<b>No Vacunados</b>	<b>Total</b>
<i>samples (n)</i>	50	50	100
<i>sum <math>\sum x_i</math></i>	882.018	866.966	1.748.984
<i>mean <math>\bar{x}</math></i>	17.640	17.339	17.490
<i>sum of squares <math>\sum x_i^2</math></i>	1.688.233	1.584.021	3.272.254
<i>samplevariance <math>s^2</math></i>	0.2700	0.1648	0.2155
<i>samplestd. dev. <math>s</math></i>	0.5197	0.4060	0.4642
<i>std. dev. of mean <math>SE_{\bar{x}}</math></i>	0.0735	0.0574	0.0464

<b>source</b>	<b>sum of squares</b>	<b>degrees of freedom</b>	<b>mean square</b>	<b>F statistic</b>	<b>p-value</b>
<i>Grupos</i>	0.0227	1	0.0227	0.1042	<b>0.7475</b>
<i>error</i>	213.082	98	0.2174		
<i>total</i>	213.308	99			

Puesto que el valor de  $p$  obtenido fue mayor que 0,05 ( $p = 0.7475$ ), se comprobó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre la media del  $\text{Log}_{10}$  (HI) de ambos grupos, con un nivel de confianza del 95%.

Aunque el análisis por ANOVA no sugirió la presencia de diferencias significativamente entre ambos grupos, también se realizó una comparación, mediante una prueba de rangos múltiples utilizando el Test de Tukey, para determinar si las medias de los animales protegidos (total o parcialmente) y los no protegidos, entre ambos grupos presentaban diferencias significativas (Tabla 4):

**Tabla 4:** Análisis de Diferencias Honestamente Significativas (HSD) por el Test de Tukey:

GRUPOS	Vacunados			No Vacunados			Total
	NP	PP	P	NP	PP	P	
<i>samples (n)</i>	5	27	18	2	37	11	100
<i>sum <math>\sum x_i</math></i>	3.9135	42.7459	41.5418	1.8062	59.3026	25.5872	174.8972
<i>mean <math>\bar{x}</math></i>	0.7827	1.5832	2.3079	0.9031	1.6028	2.3261	1.7490
<i>sum of squares <math>\sum x_i^2</math></i>	3.1718	69.0508	96.5984	1.6312	97.0524	59.7163	327.2209
<i>sample variance <math>s^2</math></i>	0.0272	0.0529	0.0426	0.0000	0.0557	0.0198	0.2155
<i>sample std. dev. <math>s</math></i>	0.1649	0.2301	0.2065	0.0000	0.2359	0.1406	0.4642
<i>std. dev. of mean <math>SE_{\bar{x}}</math></i>	0.0737	0.0443	0.0487	0.0000	0.0388	0.0424	0.0464

GRUPOS	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD <i>p-value</i>	Tukey HSD inference
NP vs NP	0.9394	0.8999947	<b><i>Insignificant</i></b>
PP vs PP	0.5053	0.8999947	<b><i>Insignificant</i></b>
P vs P	0.3110	0.8999947	<b><i>Insignificant</i></b>

**NP:** No Protegido **PP:** Parcialmente Protegido **P:** Protegidos

Con el Test de Tukey también se demostró que no existían diferencias significativas entre los niveles de protección de ambos grupos. Lo cual indica que tanto la población vacunada como la no vacunada, se comportaron de la misma manera ante la aparición de una nueva cepa del virus.

## CONCLUSIONES

Si bien, los equinos vacunados pertenecientes a la ONG “Ayuda a Caballos Maltratados” (ACMA), de Alejandro Korn, provincia de Buenos Aires, presentaron en mayor porcentaje títulos de anticuerpos protectivos contra la cepa 2018, en relación con los animales no vacunados provenientes de distintas áreas de la provincia de Buenos Aires, el análisis estadístico de ambos grupos reveló que no existían diferencias significativas entre ambas poblaciones. Es decir que la población vacunada se comportó de la misma manera que la población no vacunada, lo cual se condice con lo esperado para una cepa epizootica, ya que esta puede escapar a la protección de anticuerpo lograda por las vacunas.

El mayor porcentaje de animales protegidos hallados dentro de la población vacunada según el calendario sugerido por SENASA (trimestralmente), permite inferir que la vacuna aplicada en el grupo inmunizado brindó mayor protección contra la cepa 2018. Si

bien los títulos de IgG alcanzados mediante la vacunación son adecuados, la inmunización conseguida con el tipo de vacuna comúnmente disponible en el mercado induce una respuesta inmune de corta duración y cuantitativamente menor a la inmunidad obtenida luego de la infección natural con el virus.

Los altos niveles de protección (total o parcial) registrados dentro de la población de animales no vacunados podría deberse a que en estos animales es mucho más frecuente la infección natural por distintos tipos de cepas año tras año, lo que podría brindarles una mayor batería de anticuerpos capaces de dar inmunidad cruzada con distintos tipos de cepas. Mientras que la población vacunada, si no se cambia la vacuna, siempre es inoculada con las mismas cepas (cepas vacunales). Esto, unido al hecho de que la inmunidad asociada a la infección natural por el virus suele ser más duradera que la obtenida por vacunación, podría explicar el inesperadamente alto porcentaje de animales parcialmente protegidos registrado en la población no vacunada.

Los análisis genéticos realizados a la cepa viral causante del brote en el año 2018, reveló múltiples cambios de aminoácidos, algunos de ellos en sitios antigénicos, entre el virus que circulaba comparado con el de las cepas incluidas en las vacunas más utilizadas en la Argentina. Esto refuerza aún más la necesidad de mantener actualizadas las cepas de la vacuna de acuerdo con las recomendaciones de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, se puede deducir que los equinos inmunizados con el plan mínimo sugerido por SENASA, presentaron mayor título de anticuerpos protectores frente al brote del año 2018 en relación al grupo no vacunado. Sin embargo, se infiere que las vacunas disponibles comercialmente utilizadas para tal fin, no lograron alcanzar la protección inmunológica esperada contra la cepa epizootica del año 2018.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Barba M, Daly JM. (2016) **The Influenza NS1 Protein: What Do We Know in Equine Influenza Virus Pathogenesis?** Pathogens. 31;5(3):57
2. Bryant NA, Rash AS, Russell CA, Ross J, Cooke A, Bowman S. et al. (2009) **Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007.** Vet Microbiol. 2;138(1-2):41-52
3. Bryant NA, Rash AS, Woodward AL, Medcalf E, Helweggen M, Wohlfender F, et al. (2011) **Isolation and characterisation of equine influenza viruses (H3N8) from Europe and North America from 2008 to 2009.** Vet Microbiol. 10;147(1-2):19-27
4. Chambers TM, Shortridge KF, Li PH, Powell DG. (1994) **Rapid diagnosis of Equine Influenza by Directigen FLU-A Enzyme Immunoassay.** Vet Rec. 135(12):275-9.
5. Chambers TM, Holland RE, Lai AC. (1995) **Equine influenza - Current veterinary perspectives, part 1.** Equine Pract. 17:19-25.
6. Chambers TM, Reedy SE. (2014) **Equine influenza serological methods.** Methods Mol Biol. 1161:411-22
7. Cullinane AA, Barr B, Bernard W, Duncan JL, Mulcahy G, Smith M, et al. (2006). **Infectious diseases (chapter 1): equine influenza**, in The Equine Manual. 2nd Edn, eds Higgins A. J., Snyder J. R. (Philadelphia, PA: Elsevier Saunders), 13–18
8. Cullinane A, Elton D, Mumford J. (2010) **Equine influenza - surveillance and control.** Influenza Other Respir Viruses. 4(6):339-44
9. Cullinane A, Newton JR. (2013) **Equine influenza - A global perspective.** Vet Microbiol. 29;167(1-2):205-14
10. Daly JM, Lai AC, Binns MM, Chambers TM, Barrandeguy M, Mumford JA. (1996) **Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses.** J Gen Virol. 77(4):661-71.
11. Daly JM, Yates PJ, Newton JR, Park A, Henley W, Wood JL, et al. (2004) **Evidence supporting the inclusion of strains from each of the two co-circulating lineages of H3N8 equine influenza virus in vaccines.** Vaccine. 22(29-30):4101-9.
12. Daly JM, MacRae S, Newton JR, Wattrang E, Elton DM. (2011) **Equine influenza: a review of an unpredictable virus.** Vet J. 189(1):7-14.

13. 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.
14. Elton D, Bryant N. (2011) **Facing the threat of equine influenza.** *Equine Vet J.* 43:250-8
15. Gora IM, Kwasnik M, Zmudzinski JF, Rozek W. (2017) **Chorioallantoic membranes of embryonated chicken eggs as an alternative system for isolation of equine influenza virus.** *Virology* 514:1-7
16. Gupta AK, Anita A, Vandana B. (2003) **Detection of equine influenza viral genome by RT-PCR and RNA-DNA hybridization.** *Indian J. Biotech.* 2, 214–219
17. Hannant D, Mumford JA, Jessett DM. (1988) **Duration of circulating antibody and immunity following infection with equine influenza virus.** *Vet Rec.* 122(6):125-8.
18. Hemann EA, Kang SM, Legge KL. (2013) **Protective CD8 T cell-mediated immunity against influenza A virus infection following influenza virus-like particle vaccination.** *J Immunol.* 191(5):2486-94
19. Junior, JG. (2018). **Contribuição à vigilância da Influenza Equina no Pantanal Sul-Mato-Grossense.** Tesis (Doctorado en Ciencia Animal) - Universidad Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil. Disponible en: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1106682/1/5649.pdf>
20. Kapoor S., Dhama K. (2014) **Insight into Influenza Viruses of Animals and Humans.** Cham: Springer International Publishing, A. G., 1–222
21. Lai AC, Chambers TM, Holland RE, Morley P, Haines DM, Townsend HG, et al. (2001) **Divergent evolution of recent equine influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere.** *Arch. Virol.* 146(6):1063–74.
22. Landolt GA. (2014) **Equine influenza virus.** *Veterinary Clinics: Equine Pract.* 30, 507-522.
23. Landolt GA., Townsend HGG, Lunn DP. (2007) **Equine influenza infection,** in *Equine Infectious Diseases*, eds Sellon D. C., Long M. T. (Philadelphia, PA: Saunders; Elsevier Inc.), Chapter 12, 124–134
24. Lewis NS, Anderson TK, Kitikoon P, Skepner E, Burke DF, Vincent AL. (2014) **Substitutions near the hemagglutinin receptor-binding site determine the antigenic evolution of influenza A H3N2 viruses in U.S. swine.** *J Virol.* 88(9):4752-63
25. Lewis SA. (2009) **Influenza influences ion channels.** *J Physiol.* 587(Pt 13):3055

26. Lin C, Holland RE Jr, Donofrio JC, McCoy MH, Tudor LR, Chambers TM. (2002) **Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death.** *Vet Microbiol.* 4;84(4):357-65.
27. McKinstry KK, Dutton RW, Swain SL, Strutt TM. (2013) **Memory CD4 T cell-mediated immunity against influenza A virus: more than a little helpful.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 61(5):341-53
28. Mumford JA. (1990) **The diagnosis and control of equine influenza,** *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* 36:377
29. Nelson KM, Schram BR, McGregor MW, Sheoran AS, Olsen CW, Lunn DP. (1998) **Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination.** *Vaccine.* 16(13):1306-13.
30. Newton JR, Daly J, Spencer L, Mumford JA. (2006) **Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease.** *Vet Rec.* 158(6):185-92
31. Nocetto EO, Pecoraro MR, Galosi CM, Massone RA, Cid de la Paz V, Ando R, et al. (1989) **Aislamiento y tipificación de la cepa de virus de influenza equina actuante en la epizootia de 1985.** *Rev Med Vet.* 70:48.
32. Olguin Perglione C, Golemba MD, Torres C, Barrandeguy M. (2016) **Molecular Epidemiology and Spatio-Temporal Dynamics of the H3N8 Equine Influenza Virus in South America.** *Pathogens.* 16;5(4):61
33. Organizacion Mundial de Sanidad Animal (OIE). Equine Influenza (2008). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.** Chapter 2.5.7 (Paris: Office International Des Epizooties), 871–83
34. Paillot R, Grimmett H, Elton D, Daly JM. (2008) **Protection, systemic IFN-gamma, and antibody responses induced by an ISCOM-based vaccine against a recent equine influenza virus in its natural host.** *Vet Res.* 39(3):21
35. Park AW, Daly JM, Lewis NS, Smith DJ, Wood JL, Grenfell BT. (2009) **Quantifying the impact of immune escape on transmission dynamics of influenza.** *Science.* 30;326(5953):726-8
36. Powell DG, Burrows R, Spooner P, Mumford J, Thomson G. (1977) **Field observations on influenza vaccination among horses in Britain, 1971–1976.** *Dev Biol Stand.* 39: 347-52.
37. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. (2003). **Equine influenza, in Veterinary Medicine, A Text Book of Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses,** 9th Edn 2003; (New York, NY: Elsevier Saunders) 1144–1147

38. Singh, R. K., Dhama, K., Karthik, K., Khandia, R., Munjal, A., Khurana, S. K., ... & Van der Kolk, J. H. (2018). **A comprehensive review on equine influenza virus: etiology, epidemiology, pathobiology, advances in developing diagnostics, vaccines, and control strategies.** *Frontiers in Microbiology*, 9, 1941.
39. Sguazza GH, Panei CJ, Metz GE, Echeverría MG, Bravi ME, Fuentealba NA, *et al.* (2022) **Capítulo 2: Enfermedades virales de presentación más frecuente en equinos.** en: Manual de enfermedades de los equinos." Libros de Cátedra (Muriel MG, Ferreira V, Hernández HO. Editores. Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina). <https://doi.org/10.35537/10915/133157>
40. Sreenivasan CC, Jandhyala SS, Luo S, Hause BM, Thomas M, Knudsen DEB, *et al.* (2018) **Phylogenetic Analysis and Characterization of a Sporadic Isolate of Equine Influenza A H3N8 from an Unvaccinated Horse in 2015.** *Viruses*. 11;10(1):31.
41. Sylte MJ, Suarez DL. (2009) **Influenza neuraminidase as a vaccine antigen.** *Curr Top Microbiol Immunol* 333: 227–241
42. Timoney PJ. (1996) **Equine Influenza.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 19(3):205-11.
43. Virmani N, Singh BK, Gulati BR, Kumar S. (2008) **Equine influenza outbreak in India.** *Vet Rec*. 15;163(20):607-8
44. Waddell GH, Telgland MB, Sigel MM. (1963) **A new influenza virus associated with equine respiratory disease.** *J Am Vet: Med Ass*. 143:587-90.
45. Webby RJ, Webster RG, Richt JA. (2007) **Influenza viruses in animal wildlife populations.** *Curr Top Microbiol Immunol*. 315:67-83
46. Woodward A, Rash AS, Medcalf E, Bryant NA, Elton DM. (2015) **Using epidemics to map H3 equine influenza virus determinants of antigenicity.** *Virology*. 481:187-98
47. Yates P, Mumford JA. (2000) **Equine influenza vaccine efficacy: the significance of antigenic variation.** *Vet Microbiol*. 74(1-2):173-7.