

## **PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA INFLUENZA EQUINA EN LA REGION CENTRO-NORTE DE LA PROVINCIA DE SANTA FE, ARGENTINA, DURANTE LOS AÑOS 1997-99<sup>1</sup>**

**PINOTTI, M.<sup>2</sup>, OCCHI, H.<sup>2</sup>, LUCCA, E.<sup>3</sup>,**

**BLAINQ, L.<sup>2</sup>, LUY, D.<sup>2</sup>, & GOLLAN, A.<sup>2</sup>**

### **RESUMEN**

Se realizó un relevamiento serológico de anticuerpos contra Influenza Equina, mediante la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (I.H.A), a 219 equinos muestreados durante 1999 en el Departamento San Cristóbal, situado en la zona norte de la provincia de Santa Fe, Argentina. De los 219 sueros se obtuvo resultado positivo en 52 animales, lo que representa el 23.74% del total. Estos resultados se compararon empleando el test no paramétrico  $\chi^2$  cuadrado, con los hallados años anteriores en la misma zona (17.30% y 14.95% en 1987 y 1988 respectivamente), llegándose a la conclusión que la cobertura inmunológica, a pesar de haber experimentado variación estadísticamente significativa, persistió en niveles insuficientes para evitar hipotéticas epizootias.

*Palabras claves:* Influenza equina, vigilancia epidemiológica, prevalencia.

### **SUMMARY**

#### **Antibodies survey against Equine Influenza, on the center-north area in Santa Fe province, Argentine, during the 1997-99 years.**

A serum analysis of antibodies for Equine Influenza was taken into account. Meaning the Hemoagglutination Inhibition Method, 219 horses were selected to be searched during 1999 in San Cristobal, north side of Santa Fe, Argentina. Positive results were shown in 52 animals, representing a 23.74% in relation with the total of individuals. These findings were compared to that ones showed in past years, using  $\chi^2$  square test (17.30% and 14.95% in 1987 and 1988, respectively).

In conclusion, it make possible to say that although the immunity defense experienced some significative statistical differences, it was not enough to interrump hipotetical epizooties.

*Key words:* Equine influenza, Antibodies, epidemiologic surveillance, serologic survey.

---

1.- Proyecto subsidiado por CAI+D (UNL).

2.- Cátedra de Virología e Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Tel: (03496-420639).

E-mail: mpinotti@fcv.unl.edu.ar

3.- Cátedra de Infectología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.

Manuscrito recibido el 21 de mayo de 2002 y aceptado para su publicación el 5 de diciembre de 2002.

## INTRODUCCION

La Influenza Equina es una enfermedad respiratoria producida por un virus perteneciente a la familia Orthomyxoviridae, género Influenzavirus. Un antígeno de naturaleza nucleoproteica, la ribonucleoproteína (RNP), ubicado centralmente en la cápside aloja el genoma viral segmentado. Este antígeno constituye la base inmunoquímica de la división en tres tipos de virus Influenza: A, B y C (Pereyra *et al.*, 1964). Los equinos son afectados solo por el tipo A. El virión presenta una envoltura con dos glicoproteínas de superficie dispuestas a intervalos regulares, la Hemaglutinina (HA) y la Neuraminidasa (NA) que de acuerdo a sus características permiten la clasificación del tipo A en sub-tipos I (H7N7) y II (H3N8) (Fain Binda, 1989/90).

El virus tiene capacidad de mutar por medio de dos tipos de cambios antigénicos. Uno produce modificaciones menores y graduales dentro del subtipo ("Drift" o deriva antigénica), con participación de la respuesta inmune. El otro genera cambios mayores bruscos ("Shift" o recombinación de alta frecuencia) a causa de recombinación genética durante una infección mixta (Fain Binda, 2001). Desde el punto de vista epidemiológico, esto puede traducirse en la aparición de epidemias periódicas de difícil control.

El virus de influenza subtipo I (H7N7) fue aislado por primera vez en Praga en 1956 (Sovinová y col., 1958). Es probable que los virus de ese subtipo se hayan mantenido en caballos por centurias debido a que la enfermedad clínica fue reportada en 1754 (Mc Queen y col., 1968). Estudios evolutivos basados en análisis filogenéticos de la secuencia de nucleótidos de los genes del subtipo I indican que es el virus más antiguo de los linajes de virus influenza de

los mamíferos (Webster *et al.*, 1993). El subtipo II (H3N8), antigénicamente distinto, fue aislado de equinos en Florida en 1963 (Waddell *et al.*, 1963).

Ambos virus producen similares signos de enfermedad: tos seca, fiebre, pérdida del apetito, dolores musculares y traqueobronquitis; la infección producida por el subtipo II es usualmente más severa (Bryans, 1964; Beveridge, 1965). Durante y después de las infecciones por el subtipo II, han sido registradas bronconeumonía secundaria y miocarditis intersticial (Gerber, 1970). Desafíos experimentales mostraron que la severidad de la enfermedad está relacionada a la dosis de virus recibida y es por ello importante reducir la presión de infección durante el brote por aislamiento de los enfermos que excretan virus durante la fase aguda (Livesay *et al.*, 1993)

A pesar de su gran circulación entre los equinos, ambos subtipos mostraron relativa estabilidad antigénica en comparación con el alto grado de variabilidad serológica mostrado por los virus humanos en el mismo período de tiempo (Donatelli *et al.*, 1991). Solo han sido reportados cambios antigénicos menores en la HA o NA de virus influenza H7N7, aislados en varios países (Donatelli *et al.*, 1991). Los virus H3N8 parecen ser menos estables. Se detectaron variaciones serológicas en Brasil (Pereira *et al.*, 1972), Japón (Kono *et al.*, 1972) y Estados Unidos (Hinshaw *et al.*, 1983). En 1979 una variante del subtipo H3N8, designado como A/equine/Fontainbleau/1/79 fue aislado en Francia (Fontaine *et al.*, 1980) y esta variante es actualmente la causa más común de brotes severos de Influenza en equinos de Europa (Donatelli *et al.*, 1991) por lo que la Organización Mundial de la Salud la recomendó como cepa prototipo adicional, basándose en cambios significativos respecto al prototipo original A2/Miami.

Oxburgh *et al.* en 1998, tipificaron cuatro cepas suizas aisladas entre 1993 y 1996. Calculando los patrones filogenéticos por secuenciación de nucleótidos de los genes de la HA, concluyen que las cepas evolucionaron de dos linajes, uno europeo y otro americano. Este último llegó a ser endémico en Suiza.

Los dos subtipos de influenza equina cocircularon por muchos años (Webster R., 1993). La infección por el virus I fue comunicada por última vez en 1980 en Yugoslavia y se sospecha que ya no circula entre las poblaciones equinas. El virus tipo II es endémico en diversas regiones, inclusive en nuestro país (Barrandeguy M., 1996).

En una epidemia registrada en el Reino Unido en 1989, el subtipo A/Equine 2 (H3N8) fue aislado por primera vez desde 1981 de un equino con enfermedad aguda. Sorprendió la rápida difusión entre las poblaciones vacunadas regularmente, en contraposición a lo ocurrido en brotes anteriores en equinos europeos, en que a pesar del amplio movimiento de animales entre Gran Bretaña y el resto de los países europeos, no se registraron brotes. Es posible que hayan ocurrido cambios antigénicos en el virus, comprometiendo la eficacia de la vacunación corriente (Livesay *et al.*, 1993).

La India experimentó en 1987 una epizootia que involucró 83266 casos clínicos, registrándose 448 muertes. Gupta y otros (1993), en un estudio de caracterización, hallaron dos cepas H3N8, la Ludhiana/87, indistinguible de Fontainbleu/79 y la Bhiwani/87 antigénicamente similar al prototipo Miami/63

En Argentina hubo dos epidemias reconocidas, una a fines del 76 y 77, actuando la cepa A/equi 1 (H7N7) y la segunda a fines del 85, con cepa A/equi 2 (H3N8) (Nocetto *et al.*, 1989). Es de hacer notar que esta última epidemia ocurrió en una población equina

sometida a un esquema de vacunación obligatoria, lo que cuestiona la eficacia de las vacunas disponibles, al menos en cuanto a su capacidad para neutralizar a las nuevas cepas (Fain Binda J.C., 1989/90).

En los equinos de hipódromos el virus ingresa y se distribuye en la población con mayor frecuencia que en el campo. En los principales centros hípicas del país se registraron brotes en 1993, 1994 y 1995. Los virus aislados en dichos brotes son similares antigénicamente y genéticamente a las cepas circulantes en Estados Unidos y ligeramente diferentes de las cepas europeas (Barrandeguy M., 1996).

El objetivo del presente trabajo fue establecer el nivel de cobertura inmunológica en la población equina de la zona relevada, y compararlo con hallazgos anteriores.

## MATERIALES Y METODOS

Se obtuvieron 219 muestras de sangre de equinos adultos de diferentes edades aparentemente sanos, provenientes de establecimientos dedicados a la cría extensiva, donde no se practica la vacunación contra Influenza equina. Las tropillas son de características cerradas y su producción es vendida para reposición de establecimientos ganaderos de la región. Las muestras fueron tomadas en el Departamento San Cristóbal, situado en la zona norte de la provincia de Santa Fe, Argentina. Sus límites se hallan entre los paralelos 29 y 31 de latitud sur, y los meridianos 60 y 62 de longitud oeste, siendo su superficie de 14,850 km<sup>2</sup> y su población, según el censo de 1995, de 63,312 habitantes. Cuenta con alrededor de 10,700 equinos, aproximadamente el 12% del total de la provincia.

Los datos de los mismos fueron asentados en planillas ad hoc y las muestras

de sueros almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Antes de su utilización fueron tratadas a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos en baño termostático, inactivadas con caolín (0.02 g/5 ml de suero) durante 10 minutos a  $27^{\circ}\text{C}$  y centrifugadas a 1500 rpm, 15 minutos. La técnica utilizada para la detección de anticuerpos fue Inhibición de la Hemaglutinación (I.H.A.) en microtécnica, realizando diluciones en base 2, a partir de 1/2 (Manual e técnicas de diagnóstico virológico. FAO). Los antígenos utilizados, cedidos por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Industria y Comercio de la Provincia de Santa Fe (M.A.G.I.C.), pertenecen al subtipo II, aislado durante la epizootia de 1985. Su replicación se realizó en huevos embriónados (H.E.) de 9-11 días de incubación, titulándose por la técnica de Hemaglutinación (H.A.) ajustándose a 4 unidades hemaglutinantes (4 U.H.A.), mediante el uso de glóbulos rojos de pollo al 0.5% en solución Buffer PBS pH 7.2. El criterio para definir los reactores positivos se basó en la capacidad de los sueros para

inhibir 4 U.H.A en diluciones 1/4, sin indagar el comportamiento a diluciones más altas. Las pruebas fueron repetidas en dos ocasiones y consideradas positivas solo si los resultados eran concordantes

Para comparar los resultados obtenidos con los registrados años anteriores (Pinotti, M. *et al.*) se empleó el test no paramétrico  $\chi^2$  cuadrado, a un nivel de significación  $\alpha = 0.05$ .

## RESULTADOS

De los 219 sueros extraídos y procesados por la técnica antes descrita y utilizando antígeno de Influenza tipo II resultaron positivos 52 animales, lo que representa el 23.74% del total.

Estos resultados (Fig. 1) se compararon con el porcentaje de reactores positivos obtenidos de los relevamientos realizados durante 1997 y 1998 donde, sobre muestras de una población equina semejante, consistentes en 693 y 321 animales, se obtuvieron

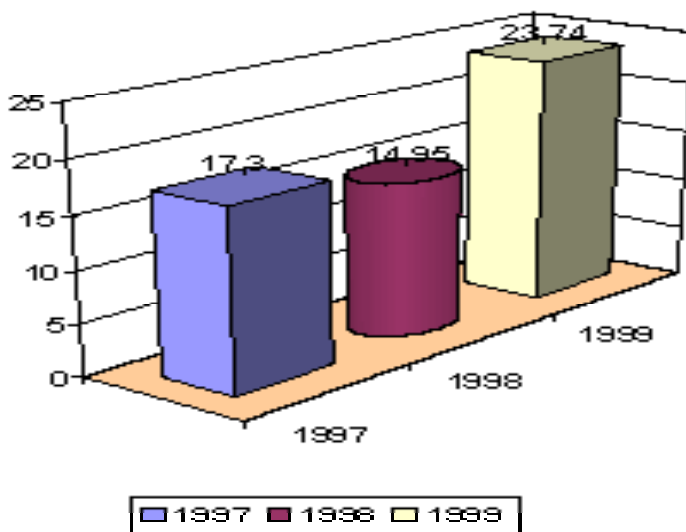


Fig. 1: Porcentaje de equinos reaccionantes a Influenza Equina durante los años 1997-1999

120 y 41 equinos positivos respectivamente (17.3% y 14.95%).

Aplicando el test de homogeneidad no paramétrico  $\chi^2$  cuadrado, con un nivel de significación  $\alpha=0.05$ , surge que entre los porcentajes de reactivos positivos de 1997 y 1998 no hay diferencias. Los resultados de 1999, por el contrario, indican diferencias estadísticamente significativas respecto a ambos.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados indican una baja tasa de anticuerpos en los animales de campo no vacunados del Departamento San Cristóbal donde se encuentra la mayor concentración de ganado caballar de la provincia, y es a su vez uno de los mayores centros de producción equina a nivel nacional.

En Influenza experimental y en pruebas a campo se ha determinado que el grado de protección contra la enfermedad clínica está estrechamente correlacionado con los niveles de anticuerpos circulantes. Con las vacunas disponibles, el nivel de anticuerpos requeridos para inducir sólida protección contra la infección se alcanza por breves períodos (Wood *et al.*, 1992). En condiciones naturales, ha sido documentado que la introducción de nuevos animales infectados que estén en el período de incubación de la enfermedad, pueden dar lugar a brotes, aun en poblaciones vacunadas (Lány *et al.*, 1995)

La infección natural, en contraste, puede proveer protección clínica por al menos un año (Hannant *et al.*, 1988). No obstante, es evidente que los cambios antigénicos que han ocurrido en los virus circulantes, los diferencian de las cepas vacunales y requieren un control permanente sobre el contenido de estas (Wood *et al.*, 1992).

Nelson *et al.*, en 1998, compararon la protección conferida por la vacunación convencional y la infección por la vía natural. En el primer caso, solo encontraron IgG (T) en el suero y luego del desafío a los 100 días se produjeron signos clínicos y liberación viral. En el segundo caso, las inmunoglobulinas halladas fueron IgA nasal y en suero los isotipos IgGa e IgGb. Luego de la recuperación de los equinos infectados experimentalmente se realizó el desafío a los 100 días, estando todos los animales completamente protegidos. Esto conduce a la conclusión que el patrón de respuesta inmunitaria a las vacunaciones convencionales no se corresponde a lo ocurrido en la infección natural.

La situación epidemiológica descrita, hace a la población en cuestión altamente susceptible a la posibilidad de epizootias de muy elevada morbilidad que se trasuntaran en enormes pérdidas de producción, con pocas posibilidades de atención médica directa debido a los sistemas extensivos de explotación. Si bien son sistemas cerrados, la circulación de equinos montados por trabajadores rurales de otro origen, pudiera ser causa de infecciones que luego difundirían con facilidad.

La probabilidad de que esto ocurra se incrementa en la medida que la insuficiente cobertura inmunológica poblacional persista en el tiempo, tal como surge de estos trabajos. El estudio de vigilancia epidemiológica basado en la presencia de títulos de anticuerpos poblacionales, es fundamental como paso previo en un eficiente programa de vacunación.

## BIBLIOGRAFIA

- BARRANDEGUY, M.** 1996. Convenio INTA-HARAS. Epidemiología y control de In-

- gripe Equina en la República Argentina. V Congreso Argentino de Virología. Tandil.
- BEVERIDGE, W. I.** 1965. Some tropical comments on influenza in horses. *Vet. Rec.* 77:42.
- BOGDAN, J.; P. MORLEY, P.; H. TOWNSEND & D. HAINES.** 1992. Effect of Influenza A/equine/H3N8 virus isolate variation on the measurement of equine antibody responses. *Can. J. Vet. Res.* 57: 126-130.
- BRYANS, J. T.** 1964. Viral respiratory disease of horses. Proc. 101<sup>st</sup>. Ann. Meeting. Am. Vet. Ass. 112.
- DONATELLI, I.; M. R. CASTRUCCI; L. CAMPITELLI; A. RUGGIERI; L. SIDOLI & C. BUONAVOGLIA.** 1991. First recovery of A/Equine/Fontainbleu/1/79 Influenza viruses in Italy. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 14, 4. 315-323.
- FAIN BINDA, J. C.** 1989/90. Influenza Animal. *Adel. En Microb. Y Enf. Infec.* Vol 8. 59.
- FAIN BINDA, J. C.** 2001. Epidemiología de la Influenza humana y animal. UNR Editora.
- FAO.** 1998. Manual e Técnicas de Diagnóstico Viroológico. 7: 1-4
- FONTAINE M.; P. AMYARD; M. M. FONTAINE & A. MORAILLONS.** 1980. Recent epidemic of equine influenza in France. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*; 3: 75-82.
- GERBER, H.** 1970. Clinical features, sequelae and epidemiology of equine influenza. In: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Conference on Equine Infectious Diseases. S. Karger. Basel. pp.
- GUPTA, A. K.; M. P. YADAV; P. K. UPPAL; J. A. MUMFORD & M. M. BINNS.** 1993. Characterisation of equine influenza isolates from the 1987 epizootic in India by nucleotide sequencing of the HA1 gene. *Equine vet. J.* 25 (2) 99-102.
- HANNANT, D.; D. M. JESSET & J. A. MUMFORD.** 1988. *Veterinary Record* 122. 125.
- HINSHAW, V. S.; C. W. NAEVE; R. G. WEBSTER; A. DOUGLAS; J. SKEHEL J. & J. BRYANS.** 1983. Analysis of antigenic variation in equine-2 influenza A viruses. *Bull- WHO* 61, 153-158.
- FAO.** 1985. Manual de técnicas de Diagnóstico Viroológico
- KONO, Y.; K. ISHIKAWA; Y. FUKUNAGA & M. FUJINO.** 1972. The first outbreak of equine influenza. In *Jap. Natn. Inst. Anim. Hlth. Q.* 12, 183-187
- LÁNY, P.; Z. POSPISIL; D. ZENDULKOVÁ; P. CIHAL & P. JAHN.** 1997. An epidemiological study on an outbreak of equine influenza in the Czech Republic in the autumn of 1995. *Veterinární Medicina* 42 (2) 39-42. University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Brno, Czech Republic.
- LIVESAY, G. J.; T. O. O'NEILL; D. HANNANT; M. P. YADAV & J. A. MUMFORD.** 1993. The outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 1989: diagnostic use of an antigen capture ELISA. *The Vet. Rec.*
- McQUEEN, J.; J. STEELE & R. ROBINSON.** 1968. Influenza in animals. *Adv. Vet. Sci.* 12: 285-336.
- NELSON, K.; B. SCHRAM; M. McGREGOR; A. SHEORAN; C. OLSEN & D. LUNN.** 1998. Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination. *Vaccine* 16 (13) 1306-1313. Dep of Med. Sc. Sch. Of Vet. Med. Un of Wisconsin. USA.
- NOCETTO, E. O.; M. R. PECORARO; C. M. GALOSI; R. A. MASSONE; V. CID DE LA PAZ; R. ANDO & M. E. ETCHEVERRIGARAY.** 1989. Aislamiento y tipificación de la cepa de virus de influenza equina actuante en la epizootia de 1985. *Rev. Med. Vet.* 70: 48.
- OSBURN, L.; L. AKERBLUM; T. FRIDBERGER; B. KLINGEBORN & T. LINNÉ.** 1998. Identification of two antigenically

- and genetically distinct lineages of H3N8 equine influenza virus in Sweden. *Epid. and inf* 120 (1) 61-70. Dep. Vet. Mic., Swedish Univ. of Ag. Sc. Uppsala, Sweden.
- PEREIRA, H. G. & V. G. MELAW.** 1964. Antigenic variants of influenza A2 virus. *Bull. WHO*, 31:129
- PEREIRA, H. G.; S. TAKIMOTO; N. S. PIEGAS & L. A. RIBEIRO de VALLE.** 1972. Antigenic variation of equine (Heq2Neq2) influenza viruses. *Bull. WHO* 47, 465-469.
- PINOTTI, M.; H. OCCHI; E. LUCCA; M. GONZÁLEZ FURNO & K. VILLALBA.** 1998. Vigilancia epidemiológica de Influenza Equina. Relevamiento serológico en equinos sanos de establecimientos de cría e intento de aislamiento en equinos con signos respiratorios. *Therios* 27:157-160.
- SOVINOVA, B.; B. TUMOVA; J. POUŠKA & J. NEMES.** 1958. Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Act. Virol.* 2: 52-61.
- WADDELL, G. H.; M. B. TELGLAND & M. M. SIGEL.** 1993. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 143: 587-590.
- WEBSTER, R. G.** 1993. Are equine I influenza viruses still present in horses? *Equine vet. J.* 25 (6) 537-538.
- WOOD, J. & J. MUMFORD.** 1992. Epidemiology of equine influenza. *The Vet. Rec.* 126.