



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Aislamiento del Virus de Influenza Equina y Detección de Anticuerpos por la Prueba Inhibición de la Hemoaglutinación.

T E S I S

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :
EUGENIO BRAVO QUINTANAR

Asesores: **MVZ. Carlos Guzmán Clark**
MVZ. América Brissa Castillo Moroy



México, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	Pág.
I.- RESUMEN.	1
II.- INTRODUCCION.	3
III.- OBJETIVOS.	5
IV.- DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD.	6
a).- Historia.	7
b).- Etiología.	8
c).- Patogénesis.	15
d).- Signos clínicos.	20
e).- Diagnóstico.	21
f).- Profilaxis, control y tratamiento.	22
V.- MATERIAL Y METODOS.	27
VI.- RESULTADOS.	44
VII.- DISCUSION.	58
VIII.- CONCLUSIONES.	63
IX.- BIBLIOGRAFIA.	65

R E S U M E N

En el presente estudio se realizó el aislamiento del virus de Influenza equina de muestras nasotraqueales tomadas a caballos de 2-6 años de edad de la raza pura sangre Inglés localizados en las instalaciones del Hipódromo de las Américas en la ciudad de México, dichas muestras se inocularon en embriones de pollo spf de 9 días de embrionados en los que se realizaron cuatro pasajes obteniéndose el 20% de los casos, positivos y títulos de 1:160-1:10240 al tipificar el virus aislado resultó positivo al antisuero A equi 2/Miami.

Conjuntamente se realizó la detección de los diferentes niveles de anticuerpos inducidos por la vacunación y virus de campo de muestras séricas pares (A y B) tomadas a los 7 y 28 días de vacunados a caballos pura raza española, a los 7 y 21 días se tomaron a caballos pura sangre Inglés para la detección de anticuerpos por virus de campo.

Las muestras se corrieron por la prueba Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), los títulos de anticuerpos inducidos por la vacunación fueron más altos que los estimulados

por el virus de campo siendo los mayores títulos para el serotipo A equi 1/Praga en todas las muestras. Las pruebas de laboratorio se corrieron en el Centro Nacional de Referencia en Salud Animal ubicado en Santa Ana Tecámac Edo. de Méx. Cabemencionar que es el primer trabajo que se realiza sobre Aislamiento del virus de Influenza equina en México.

II. INTRODUCCION

La Influenza equina es una enfermedad epizootica de etiología viral la cual se encuentra en todos los lugares de cría y explotaciones caballares expandiéndose con rapidez -- afectando principalmente a potros o caballos viejos.

El nombre de Influenza equina le fué denominado al -- realizarse el primer aislamiento del virus causante de la enfermedad en Checoslovaquia en el año de 1957, ya que formaba parte de un síndrome respiratorio sin conocerse el agente específico.

En México está presente en forma latente todo el año -- siendo más manifiesta en los cambios climáticos principalmente al final del otoño y gran parte del invierno, (Octubre a -- Febrero). Cuando se llega a presentar en primavera o en el -- verano es debido a cambios bruscos de temperatura y el tiempo postvacual ha ya sobrepasado los 120 días descubriéndose títulos de anticuerpos muy bajos incapaces de proteger (37, 36), -- es hasta ahora lo que se ha venido observando en los últimos -- años y su diagnóstico había sido meramente clínico. Al obser -- var la similitud de los signos con otras enfermedades respira

torias surgió la inquietud de aislar el virus para demostrar su presencia en varios brotes y conjuntamente corroborarlo -- con pruebas séricas mediante la detección de anticuerpos espe cíficos así como evaluar la utilidad que aportan las medidas de vacunación para poder realizar nuevos programas preventivos e implementar las pruebas menos sofisticadas para su diag nóstico; todo esto con el fin de evitar futuras pérdidas económicas en todos los sectores de explotaciones equinas así co mo colaborar a la protección de la salud animal.

III. OBJETIVOS

a).- Generales.

1.- Demostrar la presencia del virus tipo Influenza como causa de los trastornos respiratorios dentro de las instalaciones del Hipódromo de las Américas.

2.- Reafirmar el objetivo anterior mediante la detección de anticuerpos séricos y desarrollar buenos programas -- preventivos de la enfermedad. Así como la motivación de Médicos Veterinarios al desarrollo de nuevos trabajos los cuales resulten de gran utilidad a quienes ejerzan la profesión y la clínica equina.

b).- Particulares.

1.- Aislar el virus de la Influenza Equina para detectar el serotipo específico causante de los brotes presentados anteriormente en el Hipódromo de las Américas.

2.- Detectar los diferentes niveles de anticuerpos inducidos por la vacunación y virus de campo para compararlos entre sí a los 7 y 21 ó 28 días de vacunados o iniciados los signos clínicos de la enfermedad.

IV. DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD

INFLUENZA EQUINA

La Influenza Equina es una enfermedad de etiología viral provocada por cualquiera de los dos serotipos del Mixovirus de tipo Influenza, A equi 1/Praga o A equi 2/Miamia caracterizada por expandirse rápidamente en las poblaciones equinas con una alta morbilidad y baja mortalidad o nula afectando con mayor severidad a animales jóvenes o muy viejos (3, -- II). Su incidencia es epizótica, manifestándose con mayor -- frecuencia en el otoño e invierno y los signos más comúnmente observados son una tos frecuente y reseca que puede llegar a durar hasta 15 o 21 días e incluso más o desaparecer durante la primera semana, fiebre los primeros 2 a 4 días de iniciada la enfermedad y descargas nasales acuosas (5, 38).

Esta enfermedad es exclusiva del tracto respiratorio -- ya que éste tipo de virus tiene una gran afinidad por las pro -- teínas que en estos sitios se secretan (5, 17, 16).

a). HISTORIA

Antiguamente a la Influenza Equina se le conocía como síndrome respiratorio (17, 38) por desconocer las causas que provocaban los trastornos en las vías respiratorias, junto con Rinoneumonitis Viral Equina y Arteritis Viral Equina. El aborto que ahora se conoce producido por Rinoneumonitis - antes se decía que era una secuela de I. Equina; hasta 1932- que se comenzaron a diferenciar las causas de los trastornos respiratorios y la primera fue Rinoneumonitis llamándosele Virus de aborto equino. En 1956 investigadores en Praga-Checoslovaquia, lograron aislar en caballos, el virus de influenza Equina, al menos, es el primer reporte que se conoce; el virus fue identificado como un subtipo de Mixovirus Influenza A y el serotipo fue designado como actualmente se conoce, A equi I/Praga 1956. En 1957, fue aislado en los Estados Unidos; en 1963, en Inglaterra y a la fecha se ha aislado en muchos otros países.

En 1963 fue aislado en los Estados Unidos un virus - que provocaba los mismos signos clínicos que A equi I pero - más severos y fue designado A equi 2/Miami/63. Este mismo - virus fue aislado en Inglaterra, Irlanda, Francia y posteriormente en otros países de Europa Occidental por el movimiento de animales enfermos (5, 38).

Hasta ahora, son dos los serotipos de Influenza Equi

na que se conocen. El A equi I/Praga/56 A y Equi 2/Mami/63, dos virus muy similares pero antígenicamente diferentes; - tales diferencias existen en las Hemoaglutininas y en las -- Neuroaminidasas (32).

b).- ETIOLOGIA

La influenza Equina es una enfermedad causada por un virus RNA de tipo Influenza que corresponde a uno de los subgrupos de los Mixovirus, en este grupo se encuentran los virus de tipo Influenza y Parainfluenza (21), o conocidos también como Ortomixovirus y Paramixovirus o Mixovirus I y II - (9). El nombre Mixovirus fué derivado por la afinidad de este virus hacia las mucoproteínas, de ahí su selectividad por el tracto respiratorio de diferentes especies, el cual es rico en mucoproteínas por lo tanto ambos serotipos tienen en común un número de propiedades (9, 24, 13). Y han sido así clasificados por las diferencias que existen entre ambos virus y aún en cada subgrupo existen varios tipos y subtipos de Virus (Cuadro 1). Sus principales diferencias están dadas por las Hemoaglutininas que se localizan en la membrana que recubre la superficie y las Nucleoproteínas internas; ambas actúan dando la antigenicidad específica de cada serotipo -- (13, 24, 9, 30). Las diferencias en la morfología de los -- Mixovirus han conducido a ir realizando una clasificación de acuerdo a su estructura, propiedades de cada serotipo y com-

sición química principalmente.

Morfología

El Virus tipo Influenza es de forma esférica, mide aproximadamente de 80 a 120 nm. (800-1200 Å), en su genoma contiene RNA y en su superficie muestra pequeñas proyecciones que corresponden a las Hemoaglutininas y Neuraminidasa, se desconoce el porcentaje de cada una, ambas proporcionan la antigenicidad del virus; a los lados de las protusiones muestra pequeños filamentos que tal vez sean los que determinan la antigenicidad específica de los serotipos (13, 24). Las proyecciones que corresponden a las Hemoaglutininas son cilíndricas y miden aproximadamente de 80-100 Å (13); la Neuroaminidasa contiene subunidades de mayor complejidad en su morfología, es cilíndrica de aprox. 80 x 50 Å con una prolongación de 10 Å al final (24), la membrana es poco rígida y mide aprox. de 60 a 100 Å de grosor. Muestra una simetría cúbica únicamente en los ac. nucleicos y proteínas de la envoltura del virus de Influenza que encierran de 5 a 6 subunidades, en su interior el RNA se encuentra en forma helicoidal (espiral) que corresponde al antígeno RNP (proteínas ribonucleicas) (13).

Propiedades

Las propiedades que cada virus posee dependiente varios factores, es por eso que existen una gran cantidad de -

diferencias entre cada virus. Estas propiedades entre otras están dadas principalmente por su estructura, composición química, tipo de huésped y afinidad por determinados tejidos. Una de las principales propiedades es la de Hemoaglutinación de células rojas (eritrocitos) de diferentes especies o ambos serotipos hemoaglutinan eritrocitos de caballo, humano, coballo, ovinos, bovinos y aves, siendo éstos últimos los más utilizados prefiriéndose que sean de gallo (13, 24, 9); se sabe que puede hemoaglutinar de otras especies pero aún no se tienen bien estudiados, produce efecto citopático en cultivos celulares a las 8-12 hrs. post-inoculados (22), otra propiedad es que se puede reproducir en el laboratorio en embrión de pollo de 9 días de embrionados inoculados por las vías alantoidea y amniótica y en cultivos celulares. Es aislado de exudados nasales, en el diagnóstico reaccionan ante las pruebas Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), Fijación de complemento (FC°) e Inmunodifusión en Gel (IDG) siendo HI la más utilizada (4, 5, 15), es inactivado el virus por calor, luz ultravioleta, formaldehído, solventes orgánicos grasos, detergentes sintéticos y agentes oxidantes (4, 5, 16).

Composición química

Su composición química general está formada por proteínas, lípidos y carbohidratos en diferentes proporciones. Dependan de las funciones que desarrolle cada estructura del

virión. Al ser desintegrados los Mixovirus en los componentes que lo forman observamos las proporciones que muestra el cuadro núm. 2 y sus partes son de afuera hacia adentro filamentos, Hemoaglutininas, Neuraminidasa, membrana, Ribonucleoproteínas y genoma. Los filamentos y Hemoaglutininas están formados por glicoproteínas; la neuraminidasa son enzimas de estructuras netamente protéicas. La membrana está formada por lipoproteínas, las ribonucleoproteínas son polipéptidos en forma helicoidal y el genoma son Ac. nucleicos que contienen la información genética del virus (13, 24).

Clasificación y Nomenclatura

Los Mixovirus pertenecen al grupo de virus tipo RNA y han sido divididos en dos subgrupos: virus tipo Influenza y virus Parainfluenza. La Influenza posee los tipos A, B y C basándose en sus características antigénicas de las nucleoproteínas internas denominadas antígeno (NP), las hemoaglutininas Ag. (H), y las neuraminidasas Ag. (N), H y N tienen una antigenicidad muy cerrada por ser antígenos externos y característicos del virus Influenza tipo A los cuales determinan los diferentes serotipos. Otros elementos de la nomenclatura incluyen el huésped del cual fue aislado el virus, situación geográfica y año en que fue aislado.

Los antígenos H en humanos son tres, en quinos dos, en cerdos uno y en aves ocho, los antígenos N en humanos --

existen dos, en cerdos uno, en equinos dos y en aves cuatro- de origen aviar por lo que antigénicamente quedan agrupados- en doce subtipos antigénicos H y nueve subtipos antigénicos- N (30).

Los virus Influenza tipos B y C únicamente se han re- portado en humanos, los virus Parainfluenza en humanos y ani- males, (cuadro 3) (15, 24), los Ags. H y N pueden ser separa- dos de la membrana y estudiados independientemente así como- estimular la producción de anticuerpos específicos contra ca- da uno y determinados por las pruebas (IDG) y (HI), hasta -- ahora los virus de Influenza equina han quedado clasificados de la forma siguiente:

- a).- A/equi/Praga/56, (Heq1 Neq1); A equi 1/Praga/56.
- b).- A/equi/Miami/63, (Heq2 Neq2); A equi 2/Miami/63.

La clasificación de los virus A en humanos, aves y - cerdos es igual a la descripción anterior de acuerdo a cada- uno de los serotipos antigénicos H y N. (31).

CUADRO No. 1.- Diferencias entre Influenza y Parainfluenza.

	Influenza	Parainfluenza
Estructura.		
Tamaño de la partícula	800-1200 Å	1500-2500 Å
Filamentos	comunes	no usuales
Ag. RNP, diámetro	90 Å	170 Å
Ag. RNP, estructura	doble hélice	hélice simple
Coefficiente de sedim. RNA	30 S	57 S
Multiplicación		
Sensibilidad a la Actinom.	sensible	no sensible
Sitio de acumul. del RNP	núcleo	citoplasma
Genéticos.		
Fenómeno de Von Magnus	(+)	(-)
Rango de recombinación	alto	bajo
Reactivación de la multiplicación		
Inactivación de cepa	(+)	(-)

CUADRO No. 2.- Composición Química.

	RNA	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos
Virión de Influenza	0.9%	60-70%	25%	5-8%
Nucleocápside	10.0%	90%	--	--
Virión de Parainfluenza.	0.9%	73%	20%	6%
Nucleocápside	4.0%	96%	--	--

(24, 15) Maramorosh K, and Kurstak E. 1972 y Hilton B.L. 1969.

CUADRO No. 3.- Clasificación de los Mixovirus.

Subgrupos del grupo Influenza	Subgrupos de Parainfluenza
Influenza A: (Virus Influenza tipo A de humanos, cerdos, equinos, patos y aves).	Enfermedad de Newcastle Parainfluenza 1 (Sendai, virus hemoadsorción 2). Para influenza 2 (Virus asociados, Mixovirus de simio y Parainfluenza de pollo tipo-2).
Influenza B.	Parainfluenza 3 (Virus hemoadsorción tipo 1 y Parainfluenza 3 bovina).
Influenza C.	Parainfluenza 4.

(15) Hilton B.L. 1969.

c).- PATOGENESIS.

La patogénesis de la Influenza equina no ha sido bien estudiada pero se pueden tomar como referencias algunos estudios realizados en humanos, hurones, aves y ratones. Aunque existen diferencias entre cada especie en general es el mismo procedimiento que sigue el desarrollo de la enfermedad. - Se caracteriza por difundirse rápidamente, los animales la contraen por aspiración (inhalación), para que la enfermedad se desarrolle y exista recuperación o muerte depende de los factores que regulen el equilibrio entre agente, huésped y medio ambiente.

Por parte del agente son:

- 1.- Patogenicidad o virulencia.
- 2.- Capacidad de supervivencia.
- 3.- Capacidad de penetración en las membranas de la mucosa.

Del huésped son:

- 1.- Mecanismos de defensa inespecíficos.
- 2.- Mecanismos de defensa inmunológicos.

Medio Ambiente:

- 1.- Temperatura.
- 2.- Vientos y medios de comunicación.

El virus una vez inhalado tiene la capacidad de infectar a todas las células del tracto respiratorio solo que parece replicarse con mayor facilidad en las vías altas del tracto, para que esto pueda suceder antes debe de vencer los mecanismos de defensa inespecíficos tales como la actividad mucociliar y microorganismos comensales de la flora bacteriana y otros inhibidores que evitan la adhesión del virus, así como el arrastre por la secreción excesiva de moco y los reflejos tusígeno o estornudo. El virus logra pasar todas estas barreras debido a propiedades que posee y factores ambientales que le favorecen tales como las bajas temperaturas que deprimen la actividad mucociliar. También gracias a las hemoaglutininas que posee logra la adhesión en los receptores específicos que se encuentran en los cilios; una vez que el virus logra adherirse a la mucosa necesita penetrar a las células e iniciar su replicación debido a la acción de las neuraminidasas, las cuales actúan sobre el sustrato (ac. neuramínico), otros mecanismos tales como la fusión de membranas, viropexis (energía independiente) y pinocitosis se llevan a cabo en la penetración. Una vez que se introduce inicia el virus su multiplicación, es desnudado en el citoplasma de la célula, rápidamente hay liberación de las polimerasas que inhiben el metabolismo celular para que utilice la infra estructura de la célula y poder llevar a cabo su replicación. La transcripción temprana ocurre donde los segmentos de los genes aportan su información al RNAm, le sigue la traducción

temprana a los ribosomas iniciándose la síntesis de ac. nucleicos de la progenie que corresponde a la transcripción y traducción tardía. También se sintetizan proteínas tardías para el ensamble, todo esto lo realiza el retículo endoplásmico liso en donde es armada la estructura final del virus y liberado al citoplasma. Su maduración ocurre y emigra posteriormente a infectar otras células. El virus se multiplica mejor en células de las vías altas que en las bajas del tracto, ya que los neumocitos I y II son pobres en retículo endoplásmico liso, así la translocación es bloqueada por la producción de surfactante por parte de éstas células.

La reproducción viral provoca daños que desencadenan nuevos sistemas de ataque por parte del huésped, el primero es una reacción inflamatoria local que atrae fagocitos predominando polimorfonucleares (PMN) un 90% en contraste a fagocitos mononucleares (MN) encontrados en otras infecciones. Esto ocurre en la mucosa, las células inflamatorias son expulsadas y el virus es adsorbido e inactivado debido a la actividad quimotáctica de los fagocitos, luego es llevado a los órganos del sistema retículo endotelial (SRE). Los leucocitos pirógenos (PMN y MN) actúan en la interacción con los virus sobre el hipotálamo vía síntesis de prostaglandinas "E" estimulándolo a producir FIEBRES, mecanismo que va a inactivar las polimerasas liberadas por los virus y por lo tanto detener su replicación. También pueden provocar fie--

bres las endotoxinas liberadas como resultado de las necrosis celulares. Simultáneamente acude la inmunidad celular - mediante la infiltración de linfocitos T y B para dar la res puesta específica. Una vez que los anticuerpos (Acs.) específicos acuden al ataque viral, éstos bloquean las hemoaglutininas impidiendo la adhesión produciéndose también anticuerpos antinueraminidasa. Los anticuerpos logran lisar al virus desencadenando la actividad del complemento, además -- las células infectadas pueden ser destruidas por dos mecanismos mediados por los anticuerpos que son las células K y la actividad del complemento.

La actividad del interferon y las linfoquinonas no - es aún muy clara pero se ha detectado en pocas cantidades en algunas epizootias de Influenza. El virus puede adherirse - a muchas células, como a los eritrocitos pero no logra penetrar a ellos así pocas horas después es eludido y fácilmente detectado por fagocitos. In vitro puede replicarse en tejidos extrarrespiratorios pero in vivo es muy difícil e incluso la viremia es raro llegar a observarla, (34).

Para que se desarrolle la enfermedad en equinos al - igual que en humanos tienen que ocurrir los procesos que anteriormente se mencionaron y va a depender de la capacidad de supervivencia de cada uno (agente-huésped) para que se -- desarrollar la enfermedad hasta ocurrir la recuperación o --

muerte en donde se impondrá la fortaleza de uno y la debilidad de otro.

Cuando la enfermedad se presenta en equinos, les provocan lesiones multifocales en todo el revestimiento del tracto respiratorio, después de tres días la mucosa se vuelve edematosa y con infiltración linfocitaria. El grado de las lesiones durante su desarrollo dependen principalmente de la edad del huésped, patogenicidad del virus, resistencia del animal afectado, gérmenes de asociación y tratamiento ocultos que se tomen con los animales enfermos. Cuando causa la muerte en potros, regularmente ocurre al cuarto día post-infección en promedio, aunque el virus es difícil que llegue a causar la muerte por sí sólo. En la mayoría de los casos ha estado asociado a gérmenes como el Estreptococos zooepidermidiz. Los más afectados por Influenza equina son los potros y caballos viejos, causándoles graves neumonías (34) y cuando se ve en animales adultos es debido al serotipo A equi 2/miami. Cuando no existen asociaciones de gérmenes en la enfermedad la recuperación ocurre entre las tres primeras semanas post-infección, (5, 17, 30).

d).- SIGNOS CLINICOS

El primer signo que se presenta es la fiebre de --- 39-41°C, ocurre aproximadamente de 20 a 27 horas post-infección y puede durar de uno a cuatro días (5, 39), después hay anorexia, depresión, inicio de exudados acuosos; al segundo o tercer día inicia una tos reseca y frecuente que puede durar hasta tres semanas o más si se encuentra asociada a gérmenes bacterianos y no es tratada; pero si se tienen buenos cuidados con el paciente suele desaparecer en tres a ocho -- días. Los exudados se van haciendo más espesos a medida que transcurre la enfermedad o en ocasiones hasta retornan a purulentos debido a graves asociaciones. Si no desaparecen -- los signos antes de ocho a diez días es muy seguro que existan gérmenes secundarios, encontrándose frecuentemente Es- treptococo zooepidermidis. Es una enfermedad noble observada en potros o caballos viejos en la mayoría de los casos pe ro que al asociarse con neumonías bacterianas puede llegar a ser fatal, (1, 5, 39, 34).

Las lesiones macroscópicas comúnmente observadas son una inflamación de todo el tracto respiratorio con congestio namiento de las mucosas, éstas están recubiertas por grandes cantidades de exudados. En hembras gestantes aunque no se tienen evidencias claras en estadios tempranos, puede provocar reabsorciones embrionarias y en los últimos estadios li geras anomalías o debilidad en la progenie.

Las lesiones microscópicas consisten en bronquitis - difusa, edema pulmonar, miocarditis intersticial, infiltración linfocitaria en el tracto respiratorio, linfocitopenia- que puede durar de unas cuantas horas hasta 4-5 días de iniciada la enfermedad, le sigue una leucopenia y en muy raros- casos neutropenia (5). Los animales severamente afectados - pueden sufrir lesiones en hígado, aumento en la bilirrubina- sérica y enzimas, descamación de los cilios respiratorios -- llegándose a reportar encefalopatías, (5, 35).

e).- DIAGNOSTICO

La Influenza equina puede ser diagnosticada presun-- cionalmente por sus signos clínicos. Para un diagnóstico es necesario el uso de pruebas de laboratorio, las que ahora se utilizan son la Inhibición de la hemoaglutinación (HI), Inmu- nodifusión en Gel (IDG), y Fijación de Complemento (FC'). -- Pruebas para las que se requiere tener el antígeno especffi- co previamente tipificado (2, 5, 28, 25),

La prueba Inhibición de la hemoaglutinación consiste en detectar los diferentes niveles de anticuerpos especffi-- cos en el suero de animales ya sean aparentemente sanos, en- fermos o sospechosos de alguna enfermedad "X". Al correr la prueba con antígeno ya conocido y eritrocitos de alguna espe- cie capaces de ser hemoaglutinados por el virus que estamos-

usando, al no haber hemoaglutinación nos indica que en el -- suero muestra existen anticuerpos específicos contra el antigeno usado; al unirse antígeno anticuerpo se bloquea la hemoaglutinación precipitándose los eritrocitos en un tiempo -- aproximado de 30 min. (5, 29, 39).

Las pruebas Fijación de Complemento e Inmunodifusión en Gel no se utilizan por tener mayor grado de complejidad -- pero son muy útiles en el diagnóstico de enfermedades vira-- les en donde el virus no tiene la capacidad de hemoaglutinar. El diagnóstico mediante el aislamiento del virus resulta muy complejo, sin embargo se puede realizar siguiendo las técnicas ya establecidas, (4, 5, 11, 16).

f).- PROFILAXIS, CONTROL Y TRATAMIENTO

La medida más segura de prevenir la enfermedad de Influenza equina en zonas epizooticas es mediante la vacuna-- ción bivalente (serotipos A equi 1 y A equi 2), los cuales -- deben de aplicarse juntos. Repartir la vacunación a las dos o cuatro semanas para estimular la respuesta secundaria a la producción de anticuerpos y posteriormente cada cuatro o cinco meses en lugares donde se encuentren en confinamiento, -- previamente a los cambios climáticos más severos y cada seis meses en los lugares en que se encuentren más aislados (5, -- 20, 37). Se ha demostrado que en la primera aplicación el-

título de anticuerpo más alto es para el serotipo A equi 1 y los de A equi 2 son tan bajos que en algunas ocasiones no -- son detectados por la prueba HI; en la segunda aplicación el título mayor es para el serotipo A equi 2, (5, 36). Los niveles de anticuerpos pueden variar dependiendo de los títu-- los de antígeno inoculado así como del vehículo en que se en-- cuentra suspendido (adyuvante) principalmente sin desactar -- los cuidados de conservación y manejo de las vacunas.

Después de la vacunación los niveles de anticuerpos alcanzan su pico hasta los 50 ó 60 días post-vacunación manteniéndose hasta los 120 días aproximadamente comenzando a -- descender a partir de estos días. En algunos animales a los 130 días ya no son detectados por la prueba HI por lo que es necesario aplicar una revacunación y no esperar a que los títulos decaigan hasta cero, (37, 36), ver cuadros uno y dos. Los caballos con cuatro meses previamente vacunados en un -- brote mostraron signos de la enfermedad tan severos como los no vacunados, (36). En la vacunación hay dos parámetros que se deben considerar y estudiar a fondo en los sistemas de va-- cunación y son la antigenicidad (capacidad de inducir la pro-- ducción de anticuerpos) y la inmunogenicidad (capacidad de -- conferir resistencia a las infecciones), (7).

CUADRO 1.- Títulos de anticuerpos de la hemoaglutinación del virus A equi 1.

Potro	<u>Días de vacunados</u>					
	0	21	41	75	104	131
1	5	80	640	320	320	20
2	5	--	--	160	320	0
3	5	160	--	1280	160	20
4	5	20	160	160	320	0
5	5	40	160	40	--	0
6	5	80	160	320	320	0
7	5	160	640	1280	160	0
8	5	80	160	640	--	0
9	5	160	640	640	640	80
10	5	--	320	320	320	40
\bar{x}	5	97.5	360	516	320	16

-- = No realizado.

(37), Turnes C.G., Pereira J.C. y Moreira C. 1979.

CUADRO 2.- Títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación del virus A equi 2.

Potro	Días de vacunados					
	0	21	41	75	104	131
1	5	80	320	160	40	0
2	5	--	--	160	160	0
3	5	80	--	320	160	20
4	5	20	80	320	80	0
5	5	20	160	320	--	0
6	5	80	160	320	80	0
7	5	80	320	640	80	0
8	5	40	80	1280	--	0
9	5	40	320	1280	80	40
10	5	40	320	1280	160	40
\bar{x}	5	53.3	220	608	105	10

-- = No realizado.

(37), Turnes C.G., Pereira J.C. y Moreira C. 1979.

Como control en esta enfermedad es muy importante - que se tengan todos los cuidados necesarios con los animales enfermos ya que no existe un tratamiento específico, los que se practican son con el fin de evitar complicaciones secundarias y ayudar al animal a sanar más rápidamente por sí solo. Los principales cuidados son evitar el ejercicio, que esté -

el lugar ventilado pero que no tenga corrientes de aire, que no descienda mucho la temperatura y no permitir la entrada a las instalaciones de animales no vacunados o que hayan estado en lugares enzoóticos, (1, 38, 5).

El tratamiento de Influenza equina en parte es sintomático y con el fin de evitar infecciones secundarias por gérmenes oportunistas ya que no existe un tratamiento específico. Los potros tratados con penicilina han respondido positivamente al tratamiento, (34), la ampicilina logra inhibir el crecimiento del virus de Influenza pero no el de Parainfluenza, ambos in vitro. Puede utilizarse in vivo y lograr buenos resultados, (15). Se debe de tomar la temperatura constantemente para detectar la secuencia de la fiebre la cual debe de desaparecer en los primeros cuatro días. Se pueden aplicar medicamentos antipiréticos para ayudar a descender la fiebre y en ocasiones se recomienda la vacunación en los inicios de la enfermedad como medida terapéutica por la estimulación rápida de altos niveles de anticuerpos.

V. MATERIAL Y METODOS

I.- Material utilizado en el aislamiento del virus.

a).- Material Biológico:

1.- Se utilizaron 15 caballos de 2-8 años de edad de la raza pura sangre inglés de ambos sexos alojados en las instalaciones del Hipódromo de las Américas en la Ciudad de México a los cuales se les tomaron muestras de exudados nasotraqueales entre los 2 y 6 días de iniciados los signos clínicos sugestivos de Influenza equina.

2.- Se emplearon dos gallos que manifestaban todas las características de madurez a los cuales se les tomó sangre para la obtención de glóbulos rojos, los necesarios para correr las pruebas de HA y HI.

3.- Glóbulos rojos de gallo al 0.5% y al 50% en suspensión de PBS.

4.- Antisueros específicos A equi 2/Miami y una cepa Saratoga que se utilizaron en la tipificación del virus aislado.

5.- Embriones de pollo libres de patógenos específicos (spf) de 9 días de embrionados para utilizarlos en la replicación del virus.

b).- Material no biológico:

1.- En la toma de muestras de exudados se utilizó - una sonda nasotraqueal con una torunda fija en la punta, tubos de rosca de 20 cc con medio para cultivos celulares y -- artículos para la sujeción y asepsia de las fosas nasales - del caballo.

Reactivos:

- 1.- Medio para cultivos celulares.
- 2.- Antibióticos (penicilina, estreptomycin).
- 3.- Suero salino o agua bidestilada.

2.- En la replicación del virus en el laboratorio para manejo y conservación de las muestras se utilizó un refrigerador con congelador, una centrífuga y tubos estériles de 20 cc de rosca. Para la inoculación de embriones se empleó un lápiz, ovoscopio, algodón, mechero, lanceta o aguja gruesa con punta en forma de bicel, jeringas de tuberculina de - 1 cc, agujas de 1½ pulgadas de largo del No. 22 y agujas de 3/4 de pulg. de largo del No. 25 y una incubadora.

Reactivos:

- 1.- Alcohol o Iodo al 2%.
- 2.- Resistol o cemento Dupont.

3.- En la cosecha del fluido alantoideo y amniótico se utilizó algodón, tijeras de punta, pinzas de disección -- sin diente de ratón, jeringas de 3 cc estériles con aguja, - tubos de rosca de 5 y 10 cc estériles, gradillas, etiquetas para la identificación de las muestras, mechero y congelados a -70°C .

Reactivos:

- 1.- Alcohol o Iodo al 2%.

4.- En la prueba de hamaglutinación, para la preparación de las células (glóbulos rojos de gallo) se utilizó una jeringa estéril de 10 cc, agujas estériles de 22 x 32, algodón, alcohol, balanza centrífuga, tubos cónicos y pipetas de 1.5 y 10 ml.

Reactivos:

- 1.- Solución Alsevers (anticoagulante).
- 2.- Solución buffer (PBS).
- 3.- Alcohol.

5.- Para el método de hemoaglutinación en microplaca se usaron microplacas de 96 cavidades con fondo en forma de-

"U", pipetas microdilución y microtitulación de 0.025 ml.

Reactivos:

- 1.- Solución buffer (PBS).
- 2.- Agua bidestilada.
- 3.- Biológicos: glóbulos rojos de gallo y antígeno.

II.- Para la detección y determinación de anticuerpos séricos se contó con el siguiente material:

a).- Material Biológico:

1.- En la detección de anticuerpos estimulados por virus de campo se tomaron muestras pares de sangre para suero (muestras séricas) a los 7 y 21 días de iniciados los signos clínicos de 60 caballos alojados en las instalaciones -- del Hipódromo de las Américas en la Ciudad de México, 30 caballos en el Brote I presentado en los meses de Diciembre de 1981 y enero de 1982 y 30 caballos en el Brote II presentado en los meses de Marzo y Abril de 1982.

En la detección de anticuerpos estimulados por virus vacunal se tomaron muestras séricas pares a los 7 y 28 días-post-vacunales de 40 caballos de 8 meses a 8 años de edad, - de ambos sexos, pura raza españoles, alojados en la granja - "La Esperanza" del Señor Luis González Díez, ubicada en Texcoco, Edo. de México.

2.- Dos gallos a los cuales les fue extraída sangre para la obtención de glóbulos rojos.

3.- Glóbulos rojos de gallos al 50% para el lavado de los sueros y al 0.5% para correr las pruebas de Hemoaglutinación e Inhibición de la Hemoaglutinación.

4.- Antígenos específicos de Influenza equina (A equi 1/Praga y A equi 2/Miami) para la detección y determinación de los anticuerpos vacunales y de campo.

5.- En la inmunización se utilizaron 40 dosis de una vacuna bivalente que contenía los serotipos A equi 1/Praga y A equi 2/Miami reproducida en embrión de pollo, inactivada con formalina y suspendida en un vehículo que tenía como adyuvante fosfato de aluminio.

b).- Material no Biológico:

1.- En la toma de muestras séricas se utilizaron tubos vacutainer de 10 cc sin anticoagulante al vacío, agujas-vacutainer toma múltiple, centrifuga y refrigerador.

2.- En el laboratorio para el lavado de los sueros se empleó una tina de baño maría a 56°C, pipetas de 1 y 5 ml, centrifuga, balanza, refrigerador y gradillas.

Reactivos:

- 1.- 0.04 grs. de Kaolín por muestra.
- 2.- Solución buffer (PBS)

3.- Para la prueba inhibición de la hemoaglutinación se emplearon microplacas de 96 cavidades con fondo ovalado - en forma de "U", pipetas microdilución y microtitulación de 0.025 ml.

Reactivos:

- 1.- Solución bufrer (PBS).
- 2.- Agua bidestilada.
- 3.- Biológicos: glóbulos rojos, sueros tratados y antígenos específicos.

M E T O D O S

Los métodos practicados en el aislamiento del virus - como en la detección de los anticuerpos están establecidas - por "Linbro Scientific Co., Inc. New Haven, C.T." y "National Veterinary Services Laboratories" de los Estados Unidos - de Norteamérica. La técnica de inoculación de embriones fue extractada de médicos veterinarios capacitados en esta rama - que colaboran en el Centro Nacional de Regerencia en Salud - Animal.

La utilización de cada una de las técnicas y su descripción se mencionan a continuación:

1.- Técnica para el aislamiento del virus. Se describe el procedimiento en la toma de muestras de exudados y la replicación del virus en el laboratorio.

2.- Técnica de inoculación en embrión de pollo. Se cita el procedimiento de inoculación por las vías alantoidea y amniótica, así como la recolección de los fluidos alantoamnióticos.

3.- Técnica de hemoaglutinación (HA). Se utiliza para la detección de hemoaglutininas y titulación del virus.

4.- Técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI). Se toma para la tipificación del virus y la detección y determinación de anticuerpos séricos.

DESCRIPCION DE LA TECNICA PARA EL AISLAMIENTO DEL VIRUS.

a).- Toma de la Sangre.

- 1.- Tomar muestras de exudados nasofaríngeos con una sonda y torunda.
- 2.- Diluir el exudado al 20% en suspensión en TC media (medio para cultivos celulares), conteniendo 3X de antibióticos, 100,000 u y un mg penicilina

estreptomicina respectivamente (igual a I X de -
antibióticos).

- 3.- Congelar y descongelar repetidas veces.
- 4.- Centrifugar a 2500 rpm durante 20 min.
- 5.- Refrigerar.

b).- Reproducción en el laboratorio.

- 1.- Tipo de huésped, huevos embrionados spf de 8-10 días de embrionados.
- 2.- Inocular 0.2 ml por vía amniótica o alantoidea - con las jeringas de tuberculina de 1 ml y aguja del No. 22 x 1½ pulgadas para la vía amniótica o agujas del 25 X 3/4 de pulgada para la vía alantoidea.
- 3.- Observar los embriones diariamente por tres días hasta que mueran.
- 4.- Cosechar el fluido alantoamniótico y realizar un segundo y tercer pasaje como en los pasos anteriores.
- 5.- Congelar el fluido alantoideo no usado de cada pasaje a menos 70°C.
- 6.- Después del tercer pasaje al igual que en el primero y segundo cosechar el fluido alantoideo o amniótico dependiendo de la vía utilizada para observar la actividad aglutinante (aún si el em-

brión está vivo), titulando el virus que se encuentra en el fluido mediante la técnica de Hemaglutinación.

- 7.- Si la actividad aglutinante es realizada, titular el virus usando 4-8 UHA contra antisueros es pecíficos usando el sistema B y recordar correr el aislamiento contra ambos serotipos del virus- A 1 y A2.

(12).- Equine Influenza Virus, 1978.

TECNICA DE INOCULACION EN EMBRION DE POLLO.

1.- Los embriones antes de ser inoculados deben tener de 8-10 días de embrionados, incubados a 37-38°C a una humedad relativa de 40-70% y conservados a no más de 5-15°C durante los últimos 8-10 días preincubación además provenir de aves reproductoras libres de patógenos específicos (spf).

2.- Comprobar con un ovoscopio la viabilidad de los embriones 24 hrs. antes y en el momento de ser inoculados.

3.- Transportar los embriones de las incubadoras al laboratorio 24 hrs. antes de ser inoculados.

4.- El tiempo de inoculación no debe sobrepasar a las 3 ó 4 hrs. para evitar que estén fuera de la incubadora.

5.- En un cuarto oscuro ovoscopear los embriones y delimitar la cámara de aire con un lápiz.

6.- Localizar la cabeza del embrión, marcarla y en el lado opuesto delimitar el sitio de inoculación aprox. de .5 - 1 cm de distancia hacia la parte superior o inferior de la línea limitadora de la cámara de aire dependiendo de la técnica a utilizar. Para la inoculación intracavidad alantoidea se marca debajo de la línea el punto de inoculación; 1-3 mm de diámetro en un lugar desprovisto de vasos sanguíneos.

7.- Para la inoculación intracavidad amniótica se sigue el mismo procedimiento anterior con la diferencia que la inoculación es en el mismo lado en que se encuentra la cabeza del embrión ligeramente a un costado.

8.- Desinfectar con alcohol, Iodo al 2% o mercuriales el sitio de inoculación.

9.- Hacer una mínima perforación con alguna lanceta u objeto con punta en forma de bicel en el sitio marcado para la inoculación con el fin de facilitar la entrada de la aguja y evitar traumatizar al embrión.

10.- Inocular 0.2 ml de antígeno a reproducir con una jeringa de tuberculina y una aguja (dependiendo de la técnica).

ca elegida) del No. 22 de 1½ pulgadas de largo para la vía amniótica y del No. 25 de ¾ de pulgadas de largo para la vía alantoidea, todo esto en las mejores condiciones de esterilidad para evitar contaminaciones.

11.- Sellar la operación realizada para la inoculación con alguna goma adherible recomendándose Resistol o cemento Dupont.

12.- Incubar a 37°C los embriones y observarlos cada 24 hrs. hasta que mueran o dentro de las primeras 72 hrs. -- post-inoculación.

TECNICA PARA LA COSECHA DE FLUIDOS ALANTOAMNIOTICOS.

1.- Refrigerar los embriones de 12 a 24 horas antes de cosecharlos para producir una vasoconstricción de los vasos que irrigan las membranas alantoidea y amniótica.

2.- Desinfectar la zona de cámara de aire del embrión y equipo con que se trabaja en la cosecha.

3.- Con unas tijeras de punta golpear ligeramente en el centro de la cámara de aire y recortar posteriormente toda la línea marcada que la limita a una distancia de .5 cm - hasta desprenderla por completo.

4.- Con unas pinzas de disección sin diente de ratón, desprender suavemente la membrana de la pared que cubre la parte inferior de la cámara de aire (farfara).

5.- De igual manera que la anterior, desprender las membranas coraalantoidea y alantoidea o en ocasiones que sea necesario también la amniótica.

6.- Con una jeringa de 3 cc estéril colectar los fluidos alantoamnióticos apoyándose de las pinzas de disección cerradas para evitar la absorción de membranas o tejidos del embrión.

7.- Depositar los fluidos colectados en tubos de rosca de 5-10 cc estériles, usar un tubo por cada muestra inoculada.

8.- En cada pasaje checar la actividad hemoaglutinante y refrigerar los tubos con fluidos alantoideos o amnióticos, en menso de 24 hrs. congelarlos, dependiendo del tiempo en que se vuelvan a utilizar, congelar a -70°C si es muy prolongado o congelación simple si el tiempo no sobrepasa a los siete días.

DESCRIPCION DE LAS TECNICAS HEMOAGLUTINACION E INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION.

Procedimiento de HA y HI en Influenza Equina:

a).- Preparación de las células.

1.- La sangre de gallo es colectada en una solución-
Alsever's (50% solución y 50% sangre)

2.- Luego las células son enjuagadas tres veces en -
0.01 M PBS a PH de 7.2 a un volumen de sangre y 3-4 volúme--
nes de PBS, centrifugar a 15000 rpm durante 10 min. después-
de cada lavado cambiando el PBS entre cada enjuague.

3.- Preparar una concentración final de sangre de ga
llo colectada en PBS al 0.5%.

b).- Método de hemoaglutinación en microplaca.

1.- Las hemoaglutininas de Influenza equina son pro-
ducidas en embrión de pollo de 8-10 días de embrionados por-
inoculación de 0.2 ml de virus intracavidad alantoidea o am-
niótica. El fluido alantoamniótico es colectado a las 24 -
hrs. de muerto el embrión o a las 72 hrs. si aún está vivo;-
es verificado para la actividad hemoaglutinante de las hemo-
aglutininas del virus.

2.- Se usan en la titulac.ón microplacas con fondo -
en forma de "U" (96 cavidades/placa), colocar 0.05 ml de ca-

da uno de los virus a ser probados en la primera columna de cavidades.

3.- Adicionar 0.025 ml de PBS a todas las cavidades a partir de la segunda columna hasta terminar en la doceava.

4.- Con pipetas microdiluidoras de 0.25 ml iniciar la microdilución doble a partir de la primera columna de pozos los cuales contienen 0.05 ml de virus y continuar seriamente a través de los doce pozos en línea.

5.- Adicionar 0.025 ml de PBS y 0.05ml de glóbulos de gallo al 0.5% a todos los pozos incluyendo la primera columna y a una línea control que deberá tener al final 0.05 ml de PBS y 0.05 ml de glóbulos de gallo al 0.5% únicamente.

6.- Sacudir suavemente las microplacas, cubrirlas e incubar a temperatura ambiente.

7.- Leer la prueba cuando los glóbulos rojos en la línea control estén estables en el fondo de las cavidades -- (Precipitados aprox. en 30 min.).

c).- Método en la prueba Inhibición de la Hemoaglutinación.

1.- Los sueros control positivos o negativos y los sueros a ser probados son diluidos 1:5 en PBS (2 ml de dilu-

ción total) e inactivados en calor a baño maría a 56°C 30 -- min.

2.- Todos los sueros son tratados con aprox. 0.04 -- grs. de Kaolín lavados en ácido para romper Inhibidores ines pecíficos, la mezcla suero Kaolín es puesta a reaccionar durante 20 min. a temperatura ambiente agitándose cada 5 min. -- y al final centrifugar a 2500 rpm durante 30 min.

3.- Los sueros son decantados en tubos limpios y tra tados con 0.05 ml de glóbulos rojos de gallo al 50% suspen-- sión en PBS, agitar y permitir reaccionar durante 20 min. -- con agitaciones ocasionales cada 5 min., esto removerá las - aglutininas normales encontradas en algunos sueros, centrif gar a 1500 rpm durante 15 min para sedimentar los glóbulos - rojos de gallo.

4.- En una microplaca colocar 0.05 ml de los sueros- tratados en la primera columna de pozos y 0.025 ml de PBS en cada uno de los demás pozos excepto los asignados como con-- trol.

5.- Con pipetas microdiluidoras hacer diluciones se- riadas dobles a partir de la primera columna hasta las dilu- ciones deseadas recomendándose a la séptima columna.

6.- Usando el virus de Influenza equina preparado y- titulado previamente por la prueba HA, calcular la dilución-

de fluido alantoamniótico el cual deberá de contener de 4-8 unidades hemoaglutinantes por 0.025 ml. La dilución correcta de virus a ser usada en la prueba HI es determinada dividiendo el título de hemoaglutininas entre ocho, por ejemplo si la más alta dilución mostró una aglutinación completa de 1:320 cuando fue titulado de un volumen de 0.025 ml, 320 entre 8 es igual a 40 que equivale a una relación 1:4, se hace una dilución 1:4 que contendrá de 4-8 unidades hemoaglutinantes por 0.25 ml.

7.- Adicionar 0.025 ml de dilución de virus específico conteniendo 4-8 UHA (0.025 ml de dilución 1:4 como en el ejemplo), a cada uno de los sueros problema en todos los pozos excepto a los sueros control.

8.- Se pone un suero control en la última columna a una dilución de 1:10 la cual se obtiene colocando 0.025 ml de suero tratado dilución 1:5 más 0.025 ml de PBS.

9.- Una titulación final de virus es preparada en cada una de las pruebas de HI usando el procedimiento HA para estar seguros que 4-8 unidades hemoaglutinantes por 0.025 ml son usadas.

10.- Las mezclas de suero virus más los controles -- son incubados a temperatura ambiente durante una hora.

11.- Adicionar 0.05 ml de glóbulos rojos de gallo al 0.5% a todos los pozos y leer las pruebas cuando los glóbulos se encuentren establecidos (precipitados) en el fondo de los pozos de control.

(11) Equine Influenza HA and HI procedure, 1978.

VI. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el aislamiento del virus de Influenza equina y en la detección de anticuerpos por la prueba Inhibición de la hemoaglutinación se reportan en los cuadros 1 a 9 y se describen a groso modo en cada uno de éstos puntos.

Los resultados por la inoculación intracavidad amniótica no fué posible lograr con los objetivos, se cambió a la vía alantoidea, aquí se realizaron cuatro pasajes y en el último se intentó de nuevo la inoculación vía amniótica obteniéndose títulos de virus halagadores por ambas vías (cuadros 5 y 6). De las 15 muestras nasotraqueales sólo tres resultaron positivas (el 20%) observándose una correlación estrecha entre los días de toma de la muestra post-infección, la edad y los signos clínicos de ésta enfermedad, (cuadros 1 y 2):

En cada uno de los pasajes los embriones se observaron cada 24 horas. En el primer pasaje los que resultaron muertos a las 24 hrs. se desecharon al suponerse morían por contaminación o traumatismos pero en los tres subsecuentes -

se cosecharon obteniéndose de algunos muy buenos títulos. En el segundo pasaje se hicieron inoculaciones únicamente con las muestras que resultaron positivas en el primero. El tercer pasaje se realizó igual que los dos primeros observándose en éste el incremento más alto y en el cuarto pasaje se hicieron inoculaciones por las vías alantoidea y amniótica - siguiendo las técnicas ya establecidas lográndose buenos resultados por ambas vías.

En la cosecha de fluidos alantoamnióticos se colectaron todos los que no mostraron signos de contaminación, los líquidos fueron en la mayoría claros, semitransparentes y ligeramente amarillentos. Los embriones que morfan a las 48 - horas post-inoculación siempre mostraron mayores títulos; el líquido era turbio, rojizo por las partes de tejidos que éstos contenían y hemorragias más desarrolladas.

En la tipificación del virus por la prueba Inhibición de la hemoaglutinación al correrse contra antisueros específicos A equi 2/Miamia y una cepa Saratoga, resultó positivo a ambos serotipos.

Los resultados obtenidos en la detección y determinación de anticuerpos vacunales y de campo por la prueba HI se reportan en los cuadros 7, 8 y 9. Al observar dichos resultados notamos que existe un descenso en el promedio de las -

muestras A hacia B para los títulos de anticuerpos vacunales mientras que para los anticuerpos de Brote se nota un ascenso de las muestras A hacia B en ambos serotipos.

En el Brote 1 no siempre se presentaron todos los -- signos clínicos sugestivos de la enfermedad, hubo casos que únicamente presentaron fiebre, otros exudados, algunos exudados, tos y muy pocos todos los signos; se vieron afectados caballos de ambos sexos de 2 a 7 años de edad.

El Brote II fué mucho más severo que el Brote 1 afectando únicamente a potros, los cuales habían recibido una única vacunación 4 a 5 meses previos al Brote, los signos clínicos más sugestivos fueron manifiestos en mayor grado de intensidad que en el Brote I.

CUADRO 1.- Muestras inoculadas por vía alantoidea y alanto-amniótica por el aislamiento del virus.

Muestra núm.	Toma de la muestra post-infección	<u>principales signos clínicos</u>			edad
		Tos	exuds. nasales	fiebre	
1	2 días	+	+	-	3
2	2 días	+	+	-	5
3	3 días	+	+	+	3
4	3 días	+	+	+	2
5	3 días	+	+	+	2
6	3 días	+	+	+	2
7	4 días	+	+	+	5
8	4 días	+	+	+	9
9	5 días	+	+	+	2
10	5 días	+	+	+	2
11	5 días	+	+	-	3
12	5 días	+	+	+	2
13	5 días	+	+	+	2
14	6 días	+	+	-	5
15	6 días	+	+	+	8

+ = Presentó signo clínico.

- = No presentó signo clínico.

CUADRO 2.- Titulación del virus en el primer pasaje a las 24, 48 y 72 horas post-inoculación.

Muestra	Embr. inoculados.	Embriones muertos y Títulos a las:					
		24 hrs. título	---	48 hrs. título	---	72 hrs. título	---
1	3	0 m	---	0 m	---	1 m	(-)
2	3	0 m	---	0 m	---	3 m	(-)
3	3	0 m	---	1 m	(-)	1 m	(-)
4	3	0 m	---	3 m	1:16	---	---
5	3	0 m	---	2 m	1:128	1 m	(-)
6	3	0 m	---	1 m	1:128	2 m	(-)
7	3	0 m	---	0 m	---	2 m	(-)
8	3	1 m	---	0 m	---	1 m	(-)
9	3	0 m	---	0 m	---	2 m	(-)
10	3	0 m	---	0 m	---	0 m	(-)
11	3	0 m	---	0 m	---	1 m	(-)
12	3	1 m	---	2 m	(-)	---	---
13	3	2 m	---	1 m	(-)	2 m	(-)
14	3	0 m	---	0 m	---	0 m	(-)
15	3	0 m	---	0 m	---	1 m	(-)
PBS ^c	5	0 m	---	0 m	---	1 m	---
No inoc. ^c	5	0 m	---	0 m	---	0 m	---

^c = Control

m = muertos

--- = no realizados

(-) = negativos

CUADRO 3.- Titulación del virus en el segundo pasaje.

Muestra núm.	Emb. inocu- lados	Emb. muertos a las 24 hrs.	Títulos	Fluidos recolectados
4	10	10 m	1: 64	1fq. Alantoideo
5	10	10 m	1:128	1fq. Alantoideo
6	10	10 m	1: 64	1fq. Alantoideo
5 a	---	---	Neg.	1fq. Alantoamn.
6 a	---	---	1:2048	1fq. Alantoamn.
PBS ^C	5	1 m	---	
No inoculados	5	0 m	---	

Todos los embriones inoculados con muestra viral murieron a las 24 hrs. las muestras 5a y 6a se cosechó todo el fluido alantoamniótico al encontrarse rota la membrana de la cavidad amniótica.

CUADRO 4.- Titulación del virus en el tercer pasaje

Muestra núm.	Emb. inocu- lados.	Emb. muertos a las 24 hrs.	Títulos	Fluidos recolectados
4	15	15	1:2560	1fq. alantoideo
5	10	10	1:1280	1fq. alantoideo
6	10	10	1:1280	1fq. alantoideo
5a	---	---	1: 320	1fq. alantoideo
PBS ^C	3	0 m	---	
No inoculados	2	0 m	---	

Todos los embriones inoculados con muestra viral murieron a las 24 hrs.

CUADRO 5.- Titulación del virus en el cuarto pasaje por --
inoculación intracavidad alantoidea.

Muestra	Emb. inocu- lados	Emb. muertos a las 24 hrs.	Títulos	Emb. muertos a las 48 hrs.	Títulos
4	3	3 m	1: 320	---	---
5	3	2 m	1:1280	1 m	1:5120
6	3	3 m	1: 160	---	---
PBS ^c	3	0 m	---	0 m	---
No inoculados ^c	3	0 m	---	0 m	---

CUADRO 6.- Titulación del virus en el cuarto pasaje por
inoculación intracavidad amniótica.

Muestra	Emb. inocu- lados.	Emb. muertos a las 24 hrs.	Títulos
4	2	2 m	1:10240
5	2	2 m	1:1280
6	2	2 m	1:1280
PBS ^c	2	1 m	---
No inoculados	3	---	---

Siglas usadas en los cuadros anteriores:

5a y 6a = Muestras separadas originarias de las muestras 5 y
6 respectivamente.

m = Muertos

c = Control

--- = No realizados

TIPIFICACION DEL VIRUS AISLADO.

De una muestra de virus aislado con un título de --
1:160, se realizó una prueba de Inhibición de la hemoaglutinación (HI) para su tipificación, se hizo una dilución del -
virus muestra en PBS de 1:1 para obtener de 4 a 8 unidades -
hemoaglutinantes, se corrió con antisueros específicos A --
equi/Miami y una cepa Saratoga resultando positivos a ambos-
serotipos a una titulación 1:64.

CUADRO 7.- Titulación de anticuerpos inducidos por la vacunación, serotipos A equi 1/Praga y A equi 2/Miami.

Muestra núm.	A equi 1/Praga		A equi 2/Miami	
	Muestra "A"	Muestra "B"	Muestra "A"	Muestra "B"
1	≥1:640	1:320	1:160	Neg.
2	≥1:640	1:160	1: 80	1: 80
3	≥1:640	≥1:160	1:640	1: 40
4	≥1:640	1:640	1: 40	1: 80
5	≥1:640	≥1: 80	1:160	Neg.
6	≥1:640	≥1:640	1: 80	1: 80
7	≥1:160	≥1:640	Neg.	1:160
8	≥1:640	≥1:640	1:320	1:640
9	≥1:640	≥1:640	1:640	1:640
10	≥1:640	≥1:640	1:640	1:640
11	≥1:640	≥1:640	1:320	Neg.
12	≥1:640	≥1:640	1:640	1:320
13	≥1:640	≥1:640	1:10	1:160
14	≥1:640	≥1:640	1:80	1:160
15	≥1:640	≥1:640	1:20	1:320
16	≥1:640	≥1:640	1:40	1:640
17	≥1:640	≥1:640	1:640	1:160
18	≥1:640	≥1:640	1:160	1:160
19	≥1:640	≥1:640	1:10	1:320
20	≥1:640	≥1:640	1:640	1:320

CUADRO 7.- Continuación.

Muestra núm.	A equi 1/Praga		A equi 2/Miami	
	Muestra "A"	Muestra "B"	Muestra "A"	Muestra "B"
21	≈1:640	≈1:640	1:160	1:80
22	≈1:640	≈1:640	1:640	1:320
23	≈1:640	≈1:640	1:160	1:640
24	≈1:640	≈1:640	1:160	1:320
25	≈1:640	≈1:640	1:640	1:320
26	≈1:640	≈1:640	1:160	1:160
27	≈1:640	≈1:640	1:640	1:160
28	≈1:640	≈1:640	1:640	1:320
29	≈1:640	≈1:640	1:160	1:160
30	≈1:640	≈1:640	1:320	1:160
31	≈1:640	≈1:640	1:320	1:640
32	≈1:640	≈1:640	1:320	1:160
33	≈1:640	≈1:640	1:320	1:320
34	≈1:640	≈1:640	1:160	1:20
35	≈1:640	≈1:640	1:80	1:160
36	≈1:640	≈1:640	1:80	1:20
37	≈1:640	≈1:640	1:640	1:320
38	≈1:640	≈1:640	1:640	1:640
39	≈1:640	≈1:640	1:320	1:160
40	≈1:640	1:594	1:314	1:240
\bar{x}	1:628	1:594	1:314	1:240
%	1:640 97.5%	90.0%	30.0%	12.5%

CUADRO 8.- Titulación de anticuerpos estimulados por virus de campo, serotipos A equi 1/Praga y A equi -- 2/Miami en el Brote 1.

Muestra núm	A equi 1/Praga		A equi 2/Miami	
	Muestra "A"	Muestra "B"	Muestra "A"	Muestra "B"
1	1:160	1:320	1:320	1:160
2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
3	1:40	Neg.	Neg.	Neg.
4	1:40	1:160	1:80	Neg.
5	1:160	Neg.	Neg.	Neg.
6	1:40	1:320	Neg.	Neg.
7	1:160	Neg.	Neg.	Neg.
8	1:160	Neg.	Neg.	Neg.
9	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
10	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
11	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
12	1:160	Neg.	Neg.	Neg.
13	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
14	1:160	Neg.	Neg.	Neg.
15	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

CUADRO 8.- Continuación

Muestra núm.	A equi 1/Praga		A equi 2/Miami	
	Muestra "A"	Muestra "B"	Muestra "A"	Muestra "B"
16	≥ 1:640	1:320	Neg.	Neg.
17	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
18	1:160	Neg.	Neg.	Neg.
19	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
20	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
21	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
22	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
23	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
24	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
25	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
26	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
27	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
28	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
29	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
30	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
\bar{x}	1:170	1:320	1:186	1:160
% de posit.	3.36	13.3	10.0	3.3

\bar{x} Promedio.

% Porcentaje de animales positivos.

CUADRO 9.- Titulación de anticuerpos estimulados por virus -
de campo, serotipos A equi 1/Praga y A equi - -
2/Miami en el Brote II.

Muestra núm.	A equi 1/Praga		A equi 2/Miami	
	Muestra "A"	Muestra "B"	Muestra "A"	Muestra "B"
1	1:20	≥1:640	1:20	≥1:640
2	1:40	≥1:640	1:10	1:40
3	1:10	≥1:640	1:40	1:20
4	1:10	≥1:640	1:40	1:20
5	1:40	≥1:640	1:40	1:10
6	1:20	1:320	1:20	1:10
7	1:40	1:320	1:20	1:10
8	1:160	1:320	1:40	1:10
9	1:40	1:320	1:40	1:40
10	1:40	1:320	1:160	1:640
11	1:40	1:160	1:10	1:20
12	1:40	1:160	1:160	1:160
13	≥1:640	1:320	1:160	1:80
14	1:80	1:40	1:80	1:40
15	1:80	1:80	1:320	≥1:640

CUADRO 9.- Continuación

Muestra	A equi 1/Praga		A equi 2/Miami	
	Muestra "A"	Muestra "B"	Muestra "A"	Muestra "B"
16	1:160	1:160	1:320	1:320
17	1:40	1:40	1:10	1:10
18	1:160	1:80	1:80	1:640
19	1:320	1:20	1:80	1:80
20	1:160	1:80	1:160	1:20
21	1:40	1:160	1:80	1:80
22	1:320	1:80	1:160	1:320
23	1:320	1:40	1:80	1:640
24	1:320	1:320	1:80	1:640
25	1:160	1:320	1:80	1:320
26	1:160	1:160	1:40	1:160
27	1:320	1:640	1:80	1:80
28	1:320	1:160	1:40	1:80
29	1:320	1:10	1:80	1:160
30	1:320	1:40	1:80	1:80
\bar{x}	1:160	1:262	1:86	1:200

VII. DISCUSION

Por los resultados obtenidos en el aislamiento del virus como en la detección de los anticuerpos se corroboran datos que reporta la Bibliografía, así como el diagnóstico mediante los signos clínicos que manifiesta la enfermedad al lograrse los objetivos planteados.

En el aislamiento del virus vía amniótica no se obtuvieron resultados positivos a los propósitos del trabajo debido a que esta vía es muy traumática y no se tenía una previa experiencia ya que en el cuarto pasaje de la segunda fase se intentó de nuevo obteniéndose los mejores resultados para esta vía.

En la inoculación vía alantoidea las muestras 4, 5 y 6 de las 15 muestras tomadas, fueron las únicas que resultaron positivas, por lo que se deduce exista una correlación entre los parámetros edad, día de la toma de la muestra y signos clínicos resultando óptimos edad menor a tres años, tercer día de iniciada la enfermedad o el segundo día de iniciada la tos ya que es el momento en que los virus todavía -

no son atacados por los anticuerpos específicos y aún no existen graves contaminaciones secundarias que estén enmascarando la tos. Las muestras 12 y 13 tuvieron las mismas condiciones que 4, 5 y 6, con la única diferencia del día de la toma de muestra resultando negativos pero en las muestras serológicas tuvieron altos títulos de anticuerpos 1:160 lo que corrobora la importancia de dicha correlación, en la realización de cada uno de los pasajes se observó que el virus puede matar a los embriones a las 24 hrs. sin ocasionarles lesiones que aparenten ser la causa de la muerte, lo que no siempre es debida a traumatismos o contaminaciones en ese tiempo, la replicación viral óptima ocurre a las 48 hrs. post-inoculación, ya que los embriones que sobrepasan ese tiempo mueren a las 72 hrs. o más resultaron negativos o dieron títulos muy bajos siendo la misma muestra para ambos tiempos, en la inoculación vía amniótica en el cuarto pasaje los títulos fueron mayores que en la inoculación vía alantocidea posiblemente debido a que el virus tiene mayor contacto con células para su replicación, células de la membrana amniótica y del embrión mientras que en la cavidad alantocidea existen sólo las de las membranas, aparte pueden influir los componentes de cada uno de los líquidos, al inocular varios embriones con la misma muestra cada uno manifiesta diferente capacidad para la replicación del virus aportando en los resultados diferentes títulos, puede ser que interfiera la inmunidad del propio embrión o los componentes requeridos para

la replicación viral.

Al realizar la tipificación del virus aislado resultó positivo al serotipo A equi 2/Miami, no fue posible correr una prueba contra A equi 1/Praga pero se deduce que A equi 2 sea el causante de los Brotes presentados por los bajos títulos de anticuerpos presentados comparados con A equi 1, éstos títulos a los 7 días de iniciada la enfermedad son bajos. por lo que en el momento de la infección son mucho más bajos incapaces de proteger ante un Brote proliferando rápidamente el virus que encuentre menos barreras mientras que al existir mayores títulos para A equi 1, es bloqueado y muy poca cantidad de éste es suficiente para producir altos niveles de anticuerpos por ser más antigénico, además de ser menos maligno por lo que no siempre se puede afirmar como positivo al serotipo que manifieste los mayores títulos de anticuerpos.

En la detección de anticuerpos vacunales y de campo los mejores títulos son para el serotipo A equi 1/Praga por lo que podemos decir que es más antigénico que A equi 2/Miami, por eso en las vacunas bivalentes deben de contener un mayor título para A equi 2 requiriéndose un mínimo de 1:128 para A equi 1 y A equi 2, recomendándose 1:256 para A equi 1 y 1:512 para A equi 2, (20,37).

En el brote I el porcentaje de animales positivos - fué muy bajo por lo que es poco representativo, los animales que resultaron positivos la mayoría habían sido vacunados 3 meses previos al Brote y otros que fueron negativos también habían sido vacunados, todos presentaron fiebre, la mayoría exudados y muy pocos tos, al resultar un alto porcentaje negativos podemos atribuir las fiebres a otro tipo de infecciones como pueden ser algunas parasitosis o algún brote poco maligno que cedió ante niveles de anticuerpos muy bajos no detectados por la prueba HI.

En el Brote II el 100% resultó positivo a ambos sero tipos posiblemente se debió a que 120 días previos al Brote recibieron una vacunación bivalente pero a ese tiempo los niveles de anticuerpos fueron incapaces de proteger ante el Brote siendo los más bajos para A equi 2, deduciéndose fué el que tuvo menos barreras y proliferó provocando el brote al mismo tiempo que fué el virus aislado, los títulos en éste Brote fueron mayores que en el Brote I posiblemente por la vacunación previa recibida pero al ser más severo que el brote I no se excluye la inducción de anticuerpos por el virus de campo, los animales vacunados que enfermaron y mostraron títulos más bajos que los detectados en niveles vacunales posiblemente se debió a un mal manejo de conservación de las vacunas y al ser inoculadas su capacidad inmunizante fué menos potente o el tiempo post-vacunal era muy prolongado.

Los niveles de anticuerpos en la vacunación para ambos serotipos fueron en descenso de la muestra A hacia la -- muestra B, mientras que los brotes fueron en ascenso y comparados; son menores para el virus de campo, además menos capaces de permanecer e inducir inmunidad dentro de un organismo.

En las vacunas el adyuvante les permite inducir inmunidad por un mayor tiempo que el virus de campo, ya que el - adyuvante los va liberando lentamente haciendo permanente su estancia dentro del organismo, por lo tanto está estimulando continuamente la síntesis de anticuerpos, resultando mayores títulos como respuesta secundaria, manteniéndose éstos hasta 120-150 días post-vacunal en donde inicia un descenso rápido a títulos menores de 1:40 incapaces de proteger en un brote por lo que se requiere una revacunación que aumente éstos niveles en donde A equi 2 parece tener una mejor respuesta y en un momento dado es el más temido por ser el menos antigénico y más maligno.

VIII. CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos tanto en el aislamiento del virus como en la detección de anticuerpos que parecen -- ser contradictorios se concluye que el virus causante de los brotes presentados en el hipódromo de las Américas fué A -- equi 2/Miami/63 por las razones que en la discusión se describen.

El aislamiento del virus debe realizarse en embrión de pollo libres de patógenos específicos (spf) de 8-10 días de embrionados o en cultivos celulares, en embrión de pollo los embriones que mueren a las 48 hrs. post-inoculación son los que contienen mayores cantidades de virus replicado y -- una buena muestra en tres pasajes es suficiente para obtener altos títulos de virus.

En la vacunación como medida preventiva en Influenza equina para obtener una buena protección es recomendable -- aplicar una segunda vacunación 4-6 semanas después de la primera y posteriormente revacunar cada 4-6 meses en explotaciones muy confinadas o lugares altamente poblados y cada 6 me-

ses en explotaciones aisladas o lugares poco poblados, las vacunas deberán ser siempre conservadas a temperatura de refrigeración hasta el momento de su aplicación y estandarizadas a títulos no menores de 1:128 para A equi 1 y 1:256 para A equi 2, deberán ser virus inactivados y suspendidos en buen adyuvante para conservar su potencial de inmunización.

En los brotes cuando son detectados en su inicio puede aplicarse inmediatamente una vacunación como medida terapéutica debido a la rápida inducción de altos niveles de anticuerpos comparado con el virus de campo, ya que son virus inocuos y se encuentran en mayor accesibilidad ante las células del sistema inmune.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ADAMS R.H. and CHALKLY L.W. Veterinary treatment and -- medication for horseman. Equine Research Publication, - 1977.
- 2.- APOSTOLOV K. The effects of iodine on the biological ac- tivities of Mixoviruses. Journal of Hygiene, (1980) 84 (3), 381-388.
- 3.- ARMERDING D. and ROSSITER H. Induction of cytotoxic T - and B cell responses against Influenza virus infections. Infection and Immunity, (1980) 28(3), 799-811.
- 4.- CASANOVA M.A., MARTINEZ I. and ROMAN M. Aislamiento y - tipificación del virus de Influenza equina en Chile. Ar- chivos de Medicina Veterinaria de Chile, (1977) 9(2), - 91-93.
- 5.- CATCOTT E.J. and SMITHCORS J.F. Equine Medicine and Sur- gery. Segunda Edic. American Veterinary Publisher Inc. 1972.
- 6.- CHAKRAVERTY P. Comparison of haemagglutination-inhibi- tion and single-radial-haemolysis techniques for detec-

- tion of antibodies to Influenza B virus. Archives of Virology, (1980) 63, 285-289.
- 7.- COLIN McL. GRUBBS G.E. STATON E. BARTHLOW W. QUINNAN G. and ENNIS F. Comparative antigenicity and immunogenicity of A/USSR/77 Influenza vaccine in normal primed mice. Infection and Immunity, (1980) 28(1), 171-177.
 - 8.- COLLECTION media for nasal washings or nasopharyngeal swabs. National Veterinary Services Laboratories, 1978.
 - 9.- DALTONS A.J. and HAGUENAN F. Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages: an Atlas, First Edition, Academic Press, Vol. 5(11), 1973.
 - 10.- DANCHER G. COURDENT M. FEDIDA M. et PERRIN M. La grippe equine: Etude quantitative de L'etat immunitaire post-vaccinal et des correlations entre ses differents aspects. Revue Med. Vet. (1977) 128(3), 323-341.
 - 11.- EQUINE Influenza HI and HA Procedure. Linbro Scientifics Co., Inc. New Haven, C. T., 1978.
 - 12.- EQUINE Influenza virus - A1 and A2 Strains, Linbro Scientific Co., Inc. New Haven, C.T., 1978.
 - 13.- GOTO H. SHINAGAWA M. and SHIMIZU K. A serologic survey on equine Influenza for the past ten years. Jap. Jour.- Vet. Sci., (1978) 40, 367-374.

- 14.- GOTO H. and SHIMIZU K. Antigenic relationship between-
the Tokyo and the Miami strain of equine Influenza sub-
type 2 virus. Jap. Jour. Vet. Science, (1977) 39, 571--
574.
- 15.- HILTON B.L. The Biochemistry of viruses. Maral Deker, -
New York and London, 1969.
- 16.- HEYWARD J.T. KLIMAS R.A., and OBIJESKI J.F. The rapid -
concentration and purification of Influenza Virus from-
allantoic fluid. Archives of Virology, (1977) 55(1), -
107-119.
- 17.- JUB and KENNEDY. Patología de los animales domésticos,-
segunda Edición, Edit. Labor.
- 18.- KAWANO J., ONTA TOKIO., KIDA H. and YANAGAWA R. Distri-
bution of antibodies in animals against Influenza B and
C viruses. Jap. Jour. Vet. Res. (1978) 26, 74-80.
- 19.- KLINGERBORN B. and ROCKBORN G. Significant antigenic --
drift within the Influenza equi 2 subtype in Sweeden. -
Veterinary Record, (1980) 106, 363-364.
- 20.- KUCERA C.J. and BECKNHAEUER W.H. Studies on the antigeni-
city of an inactivated aluminium hidroxyde adjuvant --
equine Influenza virus vaccine. Canadian Journal of Com-
parative Medicine, (1977) 41(3), 326-331.

- 21.- LIPKIND M.A., WEISMAN Y., SHIHMANTER E. and SHOHMAN D.-
The first isolation of animal Influenza viruses in - -
Israel. Veterinary Record, (1979) 105(22), 510-511.
- 22.- MEHENDRA N. and MINOCHA H.C. Replication of swine and -
equine Influenza viruses in canine kidney cells. Am. --
Jour. of Vet. Res. (1977) 38(7), 1059-1061.
- 23.- MARAMOROSH K. and KAPROWSKI H. Methodos in virology, --
first Edit. Academic Press, New York and London, vol. -
1, 1967.
- 24.- MARAMOROSH K. and KURSTAK E. Comparative virology, Aca-
demic Press, New York and London, 1971.
- 25.- METHODOS for conducting the hemagglutination inhibition-
test for ewine Influenza antibody. National Veterina-
ry Services Laboratories, 1978.
- 26.- ONTA TOKIO., KIDA H., KAWANO J., MATSUOKA Y. and YANAGA
WA R. Distribution of antibodies against various Influen
za A viruses in animals. Jap. Jour. Vet. Sci., (1978) -
40(4), 451-457.
- 27.- PACHECO C.R. Las enfermedades de aparato respiratorio y
la salud. Gaceta Médica de México, (1980) 116 (2), 53--
64.
- 28.- PLATEAU E., CRUCIERE C., VIRAT J. et BENALET P. Gripe -
equine: Isolement caractérisation et étude sérologique-

- dans divers foyers au cours de l'épizootie 1978-1979. -
Bull. Acad. Vet. de France, (1979) 52(1), 189-194.
- 29.- ROJAS W. M. Inmunología, tercera Edición, Edit. Colina,
1976.
- 30.- RUNNELLS R.A., MONLUX W.S. and MONLUX A.W. Principios -
de patología veterinaria, primera Edición, Edit. C.E.C.
S.A. 1968.
- 31.- SCHILD G.C., NEWMAN R.W. and HINSHAW V.S. Antigenic ana-
lysis of Influenza A virus surface antigenics considera-
tion for the nomenclature of Influenza viruses. Archie-
ves of virology, (1980) 63(3/4), 171-184.
- 32.- SCHOLTISSEK C., RODHE W. and HARMS E. Biochemical stu-
dies on Influenza virus. Virology, (1977) 79(2), 393- -
404.
- 33.- SCHOLTISSEK C., RODHE W., HARMS E. and ROTT R. Correla-
tion between base sequence homology of RNA segment and
antigenicity of hemagglutinin of Influenza viruses. Viro-
logy, (1977) 79(2), 330-336.
- 34.- SMITH B.P. Influenza in foals. Jour. of Amer. Vet. Med.
Assoc. (1979) 174 (3), 289-290.
- 35.- SWEET C. and SMITH H. Patogenicity of Influenza virus.-
Microbiological Reviews, (1980) 44(2), 303-330.

- 36.- THOMSON G.R., SPOONER P.R. and POWELL D.G. The outbreak of equine Influenza in England: january 1976. Veterinary Record, (1977) 100(22), 465-468.
- 37.- TURNES C.G., PEREIRA J.C. e MOREIRA C. Avaliacao imuno gênica de vacina contra a Influenza eqüina. Revista Microbiológica, S. Paulo. (1979) 10(4), 144-147.
- 38.- VALE M.M. The illustrated veterinary encyclopedia for - horse man. Equine Research Publication, 1975.
- 39.- WATERSON A. P. Introduction to animal virology, second-Edic. Edit. Cambridge at the University Press, 1968.