

Braz. J. vet. Res. anim. Sci.,
São Paulo, v.33, n.1, p.36-40, 1996.

Influenza eqüina: avaliação da resposta imune humoral, através das reações de inibição da hemaglutinação e de hemólise radial simples, em soro de animais vacinados com vacina comercial e experimental

CORRESPONDENCE TO:
Dalva Assunção Portari Mancini
Seção de Influenza do Serviço de
Virologia
Instituto Butantan
Caixa Postal 65
Av. Vital Brasil, 1500
05504-900 - São Paulo - SP -
Brasil

Equine influenza: evaluation of the humoral immune response through the hemagglutination inhibition and single radial haemolysis, in vaccinated horses with commercial and experimental vaccines

Dalva Assunção Portari MANCINI; Rita Maria Zucatelli MENDONÇA; José Ricardo PINTO; Sebastião Teixeira de ALMEIDA

RESUMO

Foram avaliadas, através de testes de inibição da hemaglutinação (HI) e da hemólise radial simples (HRS), as respostas de anticorpos contra influenza em 4 lotes de eqüinos adultos. O grupo do lote 01 recebeu a imunização com 2 doses de vacina contra influenza, preparada experimentalmente no Instituto Butantan. Nos lotes 02 e 03, regularmente imunizados contra a influenza, foram administradas doses de reforço anual com a vacina comercial e com a vacina experimental, respectivamente. O lote 04 foi o grupo controle da avaliação. Os resultados dos testes demonstraram que as médias de títulos de HRS e IH do lote 01 apresentaram diferenças ao nível de $p < 0,001$, com significativo aumento das médias de títulos detectados nos soros após a 2ª imunização. Não foram observadas diferenças significantes entre as médias de títulos de anticorpos em soros obtidos antes e após a dose de reforço anual dos eqüinos dos lotes 02 e 03, atribuindo-se a persistência de nível de anticorpos protetores mantida após 1 ano da imunização regular com vacina comercial. A conversão sorológica dos eqüinos do lote 01, à persistência dos títulos de anticorpos nos eqüinos dos lotes 02 e 03 e, ainda, os baixos títulos de anticorpos verificados nos eqüinos não vacinados do lote 04 comprovam o resultado da resposta sorológica das duas vacinas, a experimental e a comercial, avaliadas neste trabalho.

UNITERMOS: Influenza, eqüinos, vírus; Vacinas; soro, equinos.

INTRODUÇÃO

A influenza tem mantido alto índice de morbidade em eqüinos não vacinados regularmente^{7,11}.

Estudos recentes realizados por Bandura et al.² (1991) e Appleton; Gagliardo¹ (1992) demonstram que, apesar de se evidenciar sorologicamente a presença de dois sorotipos A/Eq1 (H7N7) e A/Eq2 (H3N8) em cavalos, nos últimos dez anos o subtipo A/Eq1 (H7N7) não tem sido isolado de animais sintomáticos, permanecendo, desta forma, o subtipo A/Eq2 (H3N8) como responsável pelas epidemias de influenza em eqüinos.

Em conseqüência da capacidade de recombinação do vírus da influenza entre diferentes espécies de hospedeiros¹³, tem-se observado que o subtipo A/Eq1 (H7N7) vem diminuindo sua patogenicidade para os eqüinos e aumentando-a com relação às aves e aos animais marinhos, como focas e baleias^{5,15}.

A proteção do susceptível através de vacinação pode contribuir para a profilaxia da influenza eqüina, uma vez que es-

tudos soropidemiológicos dessa doença têm demonstrado a existência de conversão sorológica em animais imunizados de forma regular e sistemática^{3,8,9,11,14,16}.

Considerando nossa experiência anterior com imunização de eqüinos jovens (potros com idade média de 2,5 anos) pertencentes ao plantel da Fazenda São Joaquim, do Instituto Butantan, utilizando-se vacina bivalente contra influenza eqüina, A/Eq1 (H7N7) e A/Eq2 (H3N8), preparada experimentalmente por nós, propusemo-nos a estudar comparativamente o nosso produto imunobiológico com outro similar comercial, em eqüinos adultos pertencentes ao plantel da Cavalaria da Polícia Militar.

O objetivo deste estudo foi obter informações adicionais sobre a imunização contra a influenza eqüina, por meio da resposta de anticorpos em animais adultos, utilizados em atividades diárias na cidade de São Paulo e, portanto, sujeitos a constante estresse físico. Estas condições se diferenciam daquelas apresentadas no trabalho anterior¹⁰, em que foram utilizados

potros mantidos em sistema de confinamento na Fazenda São Joaquim, do Instituto Butantan.

MATERIAL E MÉTODO

Vírus

As amostras A/Eq1/SP/1/56 (H7N7) e A/Eq2/SP/1/85 (H3N8) do vírus da influenza eqüina, provenientes do Instituto Adolfo Lutz, foram cultivados em ovos embrionados de galinha (specific pathogen free), com 11 dias de incubação, através de passagens sucessivas na cavidade alantóide.

Vacinas

A vacina contra influenza eqüina foi preparada com os antígenos dos subtipos dos vírus A/Eq1 (H7N7) e A/Eq2 (H3N8) com adjuvante de Al (OH) 3 a 30%, dentro das normas da Organização Mundial da Saúde¹², para produção de vacina contra gripe de uso humano e cujas etapas foram descritas em trabalho anterior¹⁰. A vacina comercial, utilizada neste experimento, segue a mesma metodologia acima referida, empregando as mesmas amostras de vírus, assim como o mesmo adjuvante.

Testes sorológicos¹⁷

Inibição da Hemaglutinação (IH)

Este teste baseia-se na inibição da ação hemaglutinante dos vírus, através de anticorpos específicos.

Amostras de soro foram inativadas a 56°C durante 30min e tratadas com caulim a 20% em solução tampão fosfato (PBS), 0,01M, pH 7,4, para remoção de anticorpos inespecíficos. Após esse tratamento, foram feitas diluições em duplicata, seriadas, em microplacas de fundo "V". Antígeno do vírus influenza, cultivado em ovos embrionados, contendo 4 unidades hemaglutinantes, foi adicionado às cavida-

des. Após 1 hora de reação à temperatura ambiente, acrescentaram-se hemácias de galo a 0,5%. Ao fim de 30min, procedeu-se à leitura, considerando-se como título do anticorpo a recíproca da última diluição que induziu à inibição da hemaglutinação. Os soros que apresentaram títulos de anticorpos iguais ou superiores a 1/20 foram considerados positivos. O volume de 0,025ml foi constante para todos os reagentes.

Hemólise Radial Simples (HRS)

Este teste fundamenta-se na lise de hemácias de galo, sensibilizadas com vírus e mediada pelo complemento (soro fresco de cobaia), quando na presença de anticorpos específicos. Placas de poliestireno (12,5 x 8,5cm) foram preparadas com 20ml de agarose a 1%, fundida e resfriada a 43°C, adicionada de 4ml de suspensão a 10% de hemácias de galo, em solução de D.G.V. (dextrose 1g%, gelatina 0,06g% e veronal 0,03g%), sob refrigeração por 30min. Em seguida, adicionou-se à agarose, 1ml de complemento (soro fresco de cobaia) com 125 unidades CH_{50%}. Após incubação de 30min à temperatura ambiente, foram feitas 25 perfurações de 3mm de diâmetro na agarose, com distâncias de 1,5cm entre si às quais adicionaram-se os soros dos animais, previamente inativados a 56°C/30 min. Ao completarem-se 18h de incubação a 37°C em câmara úmida, foi realizada a leitura do diâmetro das áreas de hemólise. Estas medidas forneceram uma avaliação indireta da concentração de anticorpos no soro, sendo considerados reação positiva os valores iguais ou superiores a 2,0mm.

Animais

Cavalos adultos com idade média de 8 anos, pertencentes ao plantel da Cavalaria 9 de Julho da Polícia Militar do Estado de São Paulo, foram separados em 04 lotes para avaliação:

Lote 01 - Dez cavalos nunca imunizados e que receberam

Tabela 1

Títulos de anticorpos: Hemólise Radial e Simples (HRS) e inibição da Hemaglutinação (HI) em eqüinos nunca imunizados e que receberam vacina IB. São Paulo, 1994.

Cepa Cavalo nº	Eq1				Eq2			
	1ª sangria		2ª sangria		1ª sangria		2ª sangria	
	HRS	HI	HRS	HI	HRS	HI	HRS	HI
505	6.5	10	9.5	40	6.0	10	9.5	20
506	6.5	10	8.5	20	7.0	10	8.5	20
510	5.5	10	7.5	20	5.5	10	8.5	20
511	6.0	10	9.0	40	6.0	10	9.0	40
515	6.5	10	9.0	20	4.5	10	8.5	20
518	4.5	10	7.5	40	5.0	10	7.5	40
521	6.0	10	9.0	160	—	10	7.5	40
523	6.5	10	9.0	80	5.5	10	8.0	80
525	3.5	10	8.5	40	4.0	10	7.5	40
528	5.5	10	9.5	40	4.0	10	9.0	40
Média ± DP	*HRS = 5.7 ± 1.0 **HI = 10 ± 0		8.7 ± 0.71 50 ± 42		*5.27 ± 1.0 ** 10 ± 0		8.35 ± 0.71 36 ± 18	

DP = Desvio Padrão

* ** P < 0.001

Eq1 = A/Equi/Prague/1/56 (Hequi1 Nequi1)

Eq2 = A/Equi/Miane/1/63 (Hequi2 Nequi2)

02 doses de vacina contra influenza eqüina experimental do Instituto Butantan (IB).

Lote 02 - Dez cavalos já imunizados com vacina contra influenza eqüina, comercial, que receberam dose reforço anual da vacina da mesma procedência.

Lote 03 - Dez cavalos já imunizados com vacina contra influenza eqüina, comercial, e que receberam dose reforço anual da vacina experimental do IB.

Lote 04 - Cinco cavalos que não receberam vacina contra influenza eqüina e foram mantidos como controle.

Colheita de amostras de soro

Os animais foram sangrados pela via jugular.

As sangrias dos animais foram realizadas antes da imunização ou dose de reforço anual (1ª sangria) e após 30 dias das mesmas. Os soros obtidos das 1ª e 2ª sangrias foram inativados a 56°C/30min e congelados até a realização dos testes.

RESULTADOS

Os resultados apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, demonstraram as seguintes médias de títulos de anticorpos:

Lote 01 - Nos soros da 1ª e 2ª sangrias, para a cepa A/Eq1, foram obtidas, respectivamente, as médias de títulos de HRS = 5,7 ± 1,0 e 8,7 ± 0,71 e as médias de títulos de IH = 10 e 50 ± 42. Com relação à cepa A/Eq2 foram obtidas as médias de títulos de HRS = 5,2 ± 1,0 e 8,35 ± 0,71 e as médias de títulos de IH = 10 e 36 ± 18.

Lote 02 - Nos soros das 1ª e 2ª sangrias, foram obtidas, para a cepa A/Eq1, respectivamente, as médias de títulos HRS = 9,15 ± 0,53 e 9,1 ± 0,77 e médias de títulos IH = 40 ± 23 e 62 ± 40. Quanto à cepa A/Eq2, obtiveram-se as médias de títulos HRS = 8,65 ± 1,35 e 8,95 ± 0,72 e as médias de títulos IH =

24 ± 11 e 43 ± 22.

Lote 03 - Foram obtidas para a cepa A/Eq1, nos soros das 1ª e 2ª sangrias, respectivamente, as médias de títulos HRS = 9,2 ± 0,48 e 9,6 ± 0,7 e médias de títulos de IH = 59 ± 43 e 98 ± 86. Para a cepa A/Eq2, as médias de títulos HRS foram de 8,95 ± 0,89 e 9,35 ± 0,78 e as médias de títulos IH = 33 ± 25 e 50 ± 27.

Lote 04 - Nos soros das 1ª e 2ª sangrias, foram obtidas para a cepa A/Eq1, respectivamente, as médias de títulos de HRS = 5,1 ± 1,78 e 5,4 ± 1,78 e médias de títulos de IH = 10 e 10. Quanto à cepa A/Eq2, obtiveram-se as médias de títulos HRS = 3 ± 1,25 e 4 ± 0,94 e médias de títulos IH = 10 e 10.

A análise estatística dos resultados baseou-se na comparação das médias, duas a duas, pelo teste t de Student.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Com relação aos resultados obtidos do lote 01, dos cavalos imunizados com as duas doses da vacina contra influenza eqüina experimental do Instituto Butantan (IB), verifica-se que as médias de títulos de anticorpos HRS e IH, tanto para a cepa A/Eq1 como para a cepa A/Eq2, demonstraram diferenças entre elas ($P < 0,001$), o que significa ter havido aumento no nível de anticorpos séricos após a imunização.

Com relação ao lote 02, dos cavalos que já haviam sido imunizados e que receberam dose de reforço anual com vacina contra influenza eqüina comercial, verifica-se que os títulos de anticorpos HRS e de IH, tanto para a cepa A/Eq1 como para a cepa A/Eq2, não apresentaram diferenças significativas entre as médias ($p = 0,20$) (Tab. 2).

No lote 03, dos cavalos que já haviam sido imunizados com vacina contra influenza eqüina comercial, e que receberam a vacina contra influenza eqüina experimental do IB, como reforço anual, observa-se que os títulos de anticorpos HRS e IH mantiveram-

Tabela 2

Títulos de anticorpos: Hemólise Radial e Simples (HRS) e Inibição da Hemaglutinação (HI) em eqüinos já imunizados e que receberam vacina comercial como reforço anual. São Paulo, 1994.

Cepa Cavalo nº	Eq1				Eq2			
	1ª sangria		2ª sangria		1ª sangria		2ª sangria	
	HRS	HI	HRS	HI	HRS	HI	HRS	HI
17	9.0	20	8.5	40	5.0	10	7.5	10
72	9.0	40	9.0	80	9.0	20	8.5	20
464	8.0	20	8.5	80	9.0	20	9.0	80
469	9.5	80	9.5	160	10	40	10	40
487	10	40	10	40	9.0	20	9.5	20
491	9.0	20	7.5	20	8.5	10	8.5	40
498	9.0	20	10	40	8.5	20	8.5	40
502	9.5	40	9.5	40	9.0	40	9.0	40
509	9.5	40	9.5	40	9.5	40	9.5	80
513	9.0	80	9.0	80	9.0	20	9.5	40
Média ± DP	*HRS = 9.15 ± 0.53 **HI = 40 ± 23		9.1 ± 0.77 62 ± 40		*8.65 ± 1.35 ** 24 ± 11		8.95 ± 0.72 43 ± 22	

DP = Desvio Padrão

** P < 0.20

Eq1 = A/Equi/Prague/1/56 (Hequi1 Nequi1)

Eq2 = A/Equi/Miane/1/63 (Hequi2 Nequi2)

ERRATA

NA PÁGINA 39, TABELA 3:

onde se lê: “Títulos de anticorpos: Hemólise Radial e Simples (HRS) e Inibição da Hemaglutinação (HI) em eqüinos já imunizados contra influenza com vacina comercial e que receberam vacina comercial como reforço anual. São Paulo, 1994.”

leia-se: “Títulos de anticorpos: Hemólise radial simples (HRS) e Inibição da Hemaglutinação (HI) em eqüinos já imunizados contra influenza com vacina comercial e que receberam vacina IB como reforço anual. São Paulo, 1994”

NA PÁGINA 40, TABELA 4:

onde se lê: “Títulos de anticorpos: Hemólise Radial e Simples (HRS) e Inibição da Hemaglutinação (HI) em eqüinos nunca imunizados e que receberam vacina IB. São Paulo , 1994”

leia-se: “Títulos de anticorpos: Hemólise radial simples (HRS) e inibição da Hemaglutinação (HI) em eqüinos nunca imunizados e que não receberam vacina. São Paulo, 1994.”

se estáveis, tanto para a cepa A/Eq1 como para a cepa A/Eq2, cujas médias não apresentaram diferenças entre si (Tab. 3).

Observando os resultados do lote 04, dos cavalos não imunizados contra a influenza eqüina, portanto o lote controle dessa avaliação, verificaram-se baixos títulos de anticorpos HRS e IH para a cepa A/Eq1 e ainda menores para a cepa A/Eq2, e as médias de títulos de anticorpos não foram diferentes. Esses resultados são semelhantes aos da 1ª sangria dos animais do lote 01, quando estes ainda não tinham recebido imunização contra influenza (Tabs. 1 e 4).

Estudo realizado por Langer ⁹ (1966), comparando níveis de anticorpos contra influenza eqüina por meio da imunização em cavalos adultos e em potros de 3 meses de idade, imunizados contra a infecção, demonstrou que potros tiveram menores respostas de anticorpos, principalmente aqueles que já possuíam anticorpos maternos previamente adquiridos pelo colostro.

Wood et al. ¹⁰ (1983) relataram que pôneis jovens (1 ano de idade), vacinados contra influenza, apresentaram aumento dos níveis de anticorpos após a 2ª dose de vacina, mas que a partir da 14ª semana esses níveis declinaram, até mesmo em animais que haviam, inicialmente, apresentado altos níveis de anticorpos HRS e IH.

No presente trabalho foram detectados altos títulos de anticorpos HRS (9,0 e 10,5mm) e que de fato são decorrentes do estímulo antigênico das vacinas empregadas na imunização dos eqüinos, considerando que não se tem informação da ocorrência, entre esses animais, do fenômeno da "doutrina do pecado antigênico", característico da influenza humana, e ao qual se atribuem aumentos de níveis de anticorpos da "memória" imunológica, quando incitados por determinado subtipo específico do vírus da influenza que tenha causado a primo infecção no organismo humano ⁴. No Japão, Goto e colaboradores ⁶ constataram ausência deste fenômeno durante avaliação de influenza em eqüinos, em período pós-epizootico.

Ainda no que se refere aos títulos de anticorpos contra influenza em eqüinos, pudemos observar que o subtipo A/Eq1 (H7N7) apresentou títulos de anticorpos mais altos nos testes sorológicos de IH de que subtipo A/Eq2 (H3N8) (Tabs. 1, 2 e 3). Esta característica pode ser explicada pela menor variabilidade do subtipo A/Eq1 (H7N7), que lhe permite manter sua identidade antigênica original ⁷.

Em recentes estudos realizados por Gibson e colaboradores ⁵, através da técnica de seqüência de nucleotídeos, foi relatada a estabilidade do subtipo A/Eq1 (H7N7) do vírus da influenza eqüina isolado entre os anos de 1956 e 1977, cujas seqüências de aminoácidos, deduzidos dos nucleotídeos da hemaglutinina, demonstraram alto grau de homologia.

Analizando os resultados da avaliação imunitária das vacinas contra influenza eqüina comercial e experimental IB, pôde-se concluir que ambas induziram ao aumento do nível de anticorpos séricos em cavalos, tendo em vista que o nível de anticorpos em cavalos não imunizados é evidentemente inferior ao daqueles vacinados (Tabs. 1, 2, 3 e 4). Essa evidência de conversão sorológica de níveis de anticorpos pôde ser mais bem verificada no lote 01, dos cavalos que nunca haviam sido imunizados e que receberam 2 doses da vacina experimental do IB, do que nos lotes 02 e 03, onde os cavalos já haviam sido imunizados regularmente e que, portanto, mantiveram seus níveis de anticorpos protetores por 12 meses. Este fato revela que cavalos adultos respondem bem à imunização contra influenza e apresentam boa persistência de anticorpos, se compararmos com o que foi obtido em nosso trabalho anterior ¹⁰, onde os potros tiveram aumento do nível de anticorpos após a 2ª dose da vacina, mas apresentaram queda destes logo a partir da 5ª sangria, obtida após 58 dias do início da imunização. Em pesquisa similar, Kucera e colaboradores ⁸ observaram também que cavalos adultos respondiam melhor contra influenza do que cavalos jovens.

Tabela 3

Títulos de anticorpos: Hemólise Radial e Simples (HRS) e Inibição da Hemaglutinação (HI) em eqüinos já imunizados contra influenza com vacina comercial e que receberam vacina comercial como reforço anual. São Paulo, 1994.

Cepa Cavalo nº	Eq1				Eq2			
	1ª sangria		2ª sangria		1ª sangria		2ª sangria	
	HRS	HI	HRS	HI	HRS	HI	HRS	HI
4	8.5	10	8.5	20	7.5	10	8.0	20
128	9.5	40	10	40	9.0	20	9.0	40
141	9.5	20	9.5	80	8.5	20	9.5	20
270	9.5	40	10	80	9.0	40	10	20
368	10	80	10.5	320	10.5	20	10	80
374	9.0	40	9.5	80	9.0	20	9.0	80
413	9.5	80	9.5	80	10	20	10	40
419	9.5	80	10.5	160	9.5	80	10.5	80
549	9.0	160	9.5	80	8.0	80	9.0	80
645	8.5	40	8.5	40	8.5	20	8.5	40
Média ± DP	HRS = 9.2 ± 0.48 HI = 59 ± 43		9.6 ± 0.7 98 ± 86		8.95 ± 0.89 33 ± 25		9.35 ± 0.78 50 ± 27	

DP = Desvio Padrão

Eq1 = A/Equi/Prague/1/56 (Hequi1 Nequi1)

Eq2 = A/Equi/Miane/1/63 (Hequi2 Nequi2)

Tabela 4

Títulos de anticorpos: Hemólise Radial e Simples (HRS) e Inibição da Hemaglutinação (HI) em eqüinos nunca imunizados e que receberam vacina IB. São Paulo, 1994.

Cepa	Eq1				Eq2			
	1ª sangria		2ª sangria		1ª sangria		2ª sangria	
Cavalo nº	HRS	HI	HRS	HI	HRS	HI	HRS	HI
529	4.0	10	4.0	10	5.0	10	5.0	10
531	4.0	10	5.0	10	4.0	10	5.0	10
533	7.5	10	7.0	10	—	10	5.5	10
536	3.0	10	3.5	10	—	10	—	10
543	6.5	10	7.5	10	6.5	10	7.0	10
Média ± DP	HRS = 5.1 ± 1.78 HI = 10 ± 0		5.4 ± 1.78 10 ± 0		3 ± 1.25 10 ± 0		4 ± 0.94 10 ± 0	

DP = Desvio Padrão

Eq1 = A/Equi/Prague/1/56 (Hequi1 Nequi1)

Eq2 = A/Equi/Miane/1/63 (Hequi2 Nequi2)

SUMMARY

Equine Influenza: evaluation of the humoral immune response through the hemagglutination inhibition and single radial haemolysis, in horses vaccinated with commercial and experimental vaccines. From 4 equine groups, the antibody protection levels against influenza were evaluated through the hemagglutination inhibition and single radial haemolysis. One group of these animals received immunization from 2 doses of influenza vaccine, of experimental preparation, at the Butantan Institute, São Paulo, Brasil (IB). Two other horse groups, regularly vaccinated received the annual booster dose from both commercial and experimental vaccines (IB). A control group remained without vaccination. Differences were observed among the antibody level medians of the serum samples harvested prior and post immunization of those vaccinated animals. No evident differences were detected among the antibody level medians from animals that received annual booster doses, due to the persistence of the protective antibody level, 12 months after the regular immunization. In the control group, the animals showed low antibody levels, for both serum samples. In fact these results suggested the good serologic response of both vaccines, the commercial and the experimental, tested preparations.

Uniterms: Equine influenza virus; Vaccines; Serum horses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - APPLETON, J.A.; GAGLIARDO, L.F. Diversity of the antibody responses produced in ponies and mice against the equine influenza a virus H7 haemagglutinin. **Journal of General Virology**, v.73, p.1569-73, 1992.
- 2 - BANDURA, M.W.; KAWAOKA, Y.; THOMAS, T.L.; WEBSTER, R.G. Reassortants with equine 1 (H7N7) influenza virus hemagglutinin in a avian influenza virus genetic back ground are pathogenic in chickens. **Virology**, v.184, p.469-71, 1991.
- 3 - DE MEIO, J.L.; GUTENKUNST, D.E.; BEILER, J.M.; PATON, I.M.; De SANCTIS, A.N. The evaluation of an experimental bivalent equine influenza virus vaccine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.155, p.278-81, 1969.
- 4 - FASEKAS DE ST. GROTH, S.; WETSTER, R.G. Disquisitions on original antigenic sin. I. Evidence in man. **Journal of Experimental Medicine**, v.124, p.331-45, 1966.
- 5 - GIBSON, C.A.; DANIELS, R.S.; OXFORD, J.S.; Mc CAULEY, J.W. Sequence analysis of equine H7 influenza virus haemagglutinin gene. **Virus Research**, v.22, p.93-106, 1992.
- 6 - GOTO, H.; SHIMIZU, K.; TAYA; NODA, H.; TOKUNAGA, T. Antibody response of horses to equine influenza viruses during a postepizootic period in Japan. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.46, p.27-32, 1982.
- 7 - GUO, Y.J.; WANG, M.; ZHENG, S.; WANG, P.; JI, W.; CHEN, Q. Aetiologic study on an influenza-like epidemic in horses in China. **Acta Virologica**, v.35, p.190-5, 1991.
- 8 - KUCERA, C.J. The case for an adjuvanted equine influenza vaccine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.155, p.281-4, 1969.
- 9 - LANGER, P.H. Equine influenza: development of a new combination vaccine. **Veterinary Medicine & Small Animal Clinician**, v.61, p.662-8, 1966.
- 10 - MANCINI, D.A.P.; GERALDES, E.A. PINTO, J.R. Título de anticorpos em cavalos imunizados com vacina contra influenza eqüina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.28, p.171-7, 1991.
- 11 - MANCINI, D.A.P.; GERALDES, E.A.; PINTO, J.R.; SOARES, M.A. Ocorrência de influenza eqüina na Fazenda São Joaquim, São Roque, SP, do Instituto Butantan. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.25, p. 93-100, 1988.
- 12 - ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Comité OMS d'experts de la standartisation biologique. **Annexe 3. Normes revisées relatives au vaccin antigrippal** (inactivé). Genève, 1978, p.161-78 (Série de Rapports Techniques, 638).
- 13 - PEREIRA, H.G. Influenza antigenic spectrum. **Progress in Medical Virology**, v.11, p.46-79, 1969.
- 14 - REISINGER, R.C. Comments on aqueous and adjuvanted equine influenza vaccines. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.155, p.287-93, 1969.
- 15 - SCHMIDT, N.J.; EMMONS, R.W. Influenza viruses. In: NATHALIES, J.; SCHMIDT, N.J.; EMMONS, R.W., eds. **Diagnostic procedures for viral rickettsial and chlamydial infections**. 6.ed. Washington, APHA, 1989, p. 631-68.
- 16 - WOOD, J.M.; MUNFORD, J.; FOLKERS, C.; SCOTT, S.M.; SCHILD, G.C. Studies with inactivated equine influenza vaccine. **Journal of Hygiene**, London, v.90, p.371-84, 1983.
- 17 - YAMAGISHI, H.; NAGAMINE, T.; SHIMODA, K.; SEYA, I.; IGARASHI, Y.; YOSHIOKA, I.; MATUMOTO, M. Comparative measurements of equine influenza virus antibodies in horse sera by SRH, Neutral and HI tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, p.660-2, 1982.

Recebido para publicação: 02/08/94

Aprovado para publicação: 11/05/95