

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, EPIDEMIOLOGIA Y MICROBIOLOGIA

Primer informe de aislamientos del virus de la gripe A en aves silvestres en Cuba

Lic. Clara Savón*

Dr. Angel Goyenechea**

Dr. S. S. Yamnikova***

Dr. D. K. Lvov****

Savon. C. y otros: Primer informe de aislamientos del virus de la gripe A en aves silvestres en Cuba.

Se cazan 100 aves silvestres autóctonas y migratorias en la provincia de Matanzas, Municipio Ciénaga de Zapata. Se obtienen 9 aislamientos para el 9% de positividad. Se informa que de los aislamientos obtenidos, ocho se correspondieron con la fórmula antigénica H3N8, los cuales fueron recombinantes del Complejo Hong Kong; 1 se corresponde con la fórmula antigénica H7N7 similar a la cepa A/Equina/Praga/1/56 (H7N7) por su neuroaminidasa, y por su homaglutinina a la cepa A/FPV/Rostock/34 (H7N1).

INTRODUCCION

El virus de la gripe se presenta no solo en el hombre, sino también en los mamíferos y, especialmente, en las aves; por ello, el estudio de la ecología de estos virus es hoy en día de gran importancia.¹ Los estudios actuales confirman que los virus gripales A son endémicos de muchas poblaciones de aves silvestres.²

Algunos autores plantean que el surgimiento de las nuevas cepas epidémicas son producto de la recombinación de los virus del hombre y los animales y, muy especialmente, de las aves.³ Otros plantean que solamente el hombre es el reservorio del virus gripal A.⁴

* Licenciada en Biología. Responsable del Laboratorio de Ecología de Influenza. Jefe del Departamento de Microbiología.

** Jefe del Departamento de Ecología de Virus. Instituto de Virología "Ivanosky". Academia de Ciencias Médicas de la URSS.

*** Subdirector de investigaciones. Instituto de Virología "Ivanosky". Academia de Ciencias Médicas de la URSS.

En nuestro país los estudios ecológicos se comenzaron en 1976, realizándose encuestas serológicas en diferentes mamíferos y aves.⁵ En 1978 se comenzaron los estudios ecoviroológicos en aves silvestres y domésticas.

El objetivo de este trabajo es hacer un estudio ecoviroológico en aves silvestres autóctonas en la Ciénaga de Zapata, provincia de Matanzas, zona que constituye un refugio natural de aves, e intentar aislamientos del virus gripal A.

MATERIAL Y METODO

Se cazaron 100 aves silvestres autóctonas y migratorias en la Ciénaga de Zapata, provincia de Matanzas en el período comprendido entre noviembre de 1981 a Abril de 1983.

A. TOMA DE MUESTRA

A todas las aves cazadas se les hizo exudado traqueal, cloacal y se le tomó muestra de órganos (pulmones, hígado y bazo). Cada una de las muestras por separado se conservaron en frascos estériles con solución amortiguadora de fosfato-glicerina con igual cantidad de solución de transporte con 1000 000 de unidades de penicilina y 1 g de estreptomycin por cada 500 ml de solución amortiguadora $\text{pH} = 7,2$, en volumen de 0,8 ml para los exudados traqueales y cloacales y de 1,5 ml para los órganos.

B PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

A los exudados traqueales y cloacales se les retiró el hisopo, exprimiéndolo en las paredes del tubo, que completó el volumen hasta 0,8 ml con PBS, al cual se le añadió 0,1 ml de una solución de antibióticos que contenían: penicilina 100 000 de unidades, estreptomycin 50 000 unidades, gentamicina 8 mg y kanamicina 50 000 unidades por ml de solución.

Los órganos fueron macerados en morteros estériles con arena, y se hizo una suspensión al 20 % en PBS que tenía solución combinada de antibiótico.

C AISLAMIENTO

Las muestras por separado fueron inoculadas en embriones de pollo de cáscara blanca de 9 a 10 días. previo marcaje en ovoscopio de la cavidad amniótica; la incubación fue de 48 horas. La cosecha se recogió en frascos estériles, se tituló, y se conservó a 4°C.

A cada muestra se le dieron 3 pases ciegos hasta lograr el aislamiento.⁶

D IDENTIFICACION

1. La identificación del tipo viral se realizó por el método de inmunofluorescencia directa⁷ con suero marcado tipos A y B en el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, MINSAP.

2. La estructura y fórmula antigénicas fueron identificadas por las reacciones de inhibición de la hemaglutinación e inhibición de la actividad de la neuroaminidasa con sueros patrones y antisueros monoclonales, de acuerdo con la técnica recomendada por la OMS,⁸ procedentes de los centros de referencia de las Américas y de Europa Oriental.

La identificación de la estructura antigénica fue realizada en el Instituto de Virología "D.I. Ivanosky", de la Academia de Ciencias Médicas de la URSS.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se muestran los aislamientos obtenidos; como fueron observados 8 de los 9 aislamientos se correspondieron con la fórmula antigénica H3N8, y 1 con la fórmula H7N7.

Tabla 1. *Aislamientos de virus de la gripe A en aves silvestres de la Ciénaga de Zapata, noviembre 1982-abril 1983. Localidad: canal de los sábalos*

captura	Orden	Familia	Tipo de ave	Tipo de muestra	Nombre vulgar	Nombre de cepa	Fórmula anti-génica
9-11-82	Gruiformes	<i>Rallidae</i>	A	Cloacal	Gallereta Pico Rojo	A/ <i>Gallinula chloropus cerceris</i> /Cuba/5/82	H3N8
9-11-82	Gruiformes	<i>Rallidae</i>	A	Cloacal	Gallereta Pico Rojo	A/ <i>Gallinula chloropus cerceris</i> /Cuba/6/82	H3N8
9-11-82	Gruiformes	<i>Rallidae</i>	A	Cloacal	Gallereta Pico Ajo	A/ <i>Gallinula chloropus cerceris</i> /Cuba/7/82	H3N8
9-11-82	Gruiformes	<i>Rallidae</i>	A	Cloacal	Gallereta Pico Rojo	A/ <i>Gallinula chloropus cerceris</i> Cuba/8/82	H3N8
9-11-82	Anseriformes	<i>Antidae</i>	M	Cloacal	Pato Huyuyo	A/ <i>Aix sponsa</i> /Cuba 9/32	H3N8
10-11-82	Anseriformes	<i>Antidae</i>	M	Cloacal	Pam Huyuyo	A/ <i>Aix sponsa</i> /Cuba/13/82	H3N8
10-11-82	Anseriformes	<i>Antidae</i>	A	Cloacal	Pato Huyuyo	A/ <i>Aix sponsa</i> /Cuba/15/82	H3N8
10-2-83	Gruiformes	<i>Rallidae</i>	A	Organo	Gallereta Pico Rojo	A/ <i>Gallinula chloropus cerceris</i> /Cuba/98/83	H3N8
10-2-83	Gruiformes	<i>Rallidae</i>	M	Organo	Gallereta Pico Rojo	A/ <i>Fulica americana</i> /Cuba/102/83	H3N8

Leyenda: A — Autóctona.
M — Migratoria.

Estos aislamientos se correspondieron con dos ordenes, dos familias y 3 especies de aves; 2 de estas especies anidan en Cuba y es una autóctona.⁹ De la especie *Gallinula chloropus*, *cerceris*, que forma parte de nuestra ornitofauna se obtuvieron 5 aislamientos, lo que parece indicar que nuestra avifauna desempeña una función importante en la circulación de virus.

En la tabla 2 se reflejaron los resultados del estudio del tipo de hemaglutinina, y ocho de los agentes hemaglutinantes fueron identificados como hemaglutinina H₃ y uno como hemaglutinina H₇.¹⁰

Tabla 2. Resultados obtenidos en la reacción de inhibición de la hemaglutinación con sueros hiperinmunes estándares para la tipificación de la hemaglutina

Sueros hiperinmunes	Agentes hemaglutinantes									
	5	6	7	8	9	13	15	98	102	
A/PR/8/34 (H1N1)										
A/FM/1/47 (H1N1)										
A/URSS/90/77 (H1N1)										
A/Sivine/Iowa/15/30 (H1N1)										
A/Sivine/Wisconsin/67 (H1N1)										
A/Singapur/1/57 (H2N2)										
A/Hong Kong/1/68 (H3N2)	320	6280	160	160	320	160		160	320	
A/Equina/Miami/1/63 (H3N8)	80	80	20	20	40	40		20	20	
A/Pato/Ukrania/1/63 (H3N8)	2560	2560	1280	1280	2560	1280		20	20	
A/Pato/Checoslovaquia/56 (H4N6)										
A/Golondrina/Sur Africa/61 (H5N3)										
A/Pavo/Massachusetts/3740/65 (H6N2)										
A/Equina/Praga/1/56 (H7N7)								1280		
A/Pavo/Ontario/6118/68 (H8N4)										
A/Pavo/Wisconsin/66 (H9N2)										
A/Pollo/Alemania/N/49 (H10N7)										
A/FPV/Rostock/34 (H7N1)								2560		
A/Pato/Inglaterra/56 (H11N6)										
A/Pato/Alberta/60/76 (H12N5)										

Sin embargo, existieron diferencias entre ellas; así, por ejemplo, las cepas A/*Gallinula chloropus cerceris*/Cuba/5/82, A/*Gallinula chloropus cerceris*/Cuba/7/82, A/*Gallinula chloropus cerceris*/Cuba/8/82, A/*Aix sponsa*/Cuba/9/82 y A/*Aix sponsa*/Cuba/13/82 y sus hemaglutininas H₃, fueron más próximas a la hemaglutinina de A/Pato/Ukrania/1/63; no así con la A/Equina/Miami/1/63, pero sí presentaron mayor similitud con la hemaglutinina de la cepa marcadora para las hemaglutininas H₃, es decir, A/Hong Kong/1/68 (H3N2) fue bastante notable. Este resultado de la hemaglutinina está de acuerdo con los trabajos de Webster y Laver (1972 y 1973), las cuales al estudiar los polipeptidos de las cepas A/Pato/Ukrania/1/63 (H3N8), A/Equina/Miami/1/63 (H3N8), A/Hong Kong/1/68 (H3N2), y la A/Singapur/1/57 (H2N2), determinaron que las hemaglutininas de A/Pato/Ukrania/1/63 (H3N8) y A/Equina/Miami/1/63 (H3N8) eran más similares a la A/Hong Kong/1/68 (H3N2) que la cepa humana predecesora; es decir, que 5 años antes de la aparición del tipo Hong Kong la hemaglutinina H₃ circulaba en las poblaciones de aves silvestres.^{11,12}

Tabla 3. Resultados obtenidos en la reacción de inhibición de la actividad de la neuroaminidasa para la tipificación de la neuroaminidasa

Sueros hiperinmunes	Agentes hemaglutinantes									
	5	6	7	8	9	13	15	98	102	
A/New Jersey/8/76 (H1N1)	+	+	+	+	+	+	9	+	+	
A/Bell/42 (H1N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A/Japón/305/57 (H2N2)	X	A	H	+	+	+	+	+	+	
A/Port Chamblers/1/73 (H3N2)	+	+	+	+	+	A	+	+	+	
A/Golondrina/Sur Africa/61 (H5N3)	+	+	A	*	+	+	+	+	+	
A/Pavo/Inglaterra/63 (H7N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A/Pavo/Ontario/6118/68 (H8N4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A/Shearwater/Australia/1/72 (H6N5)	+	*	+	+	A	+	A	+	A	
A/Pato/Inglaterra/56 (H4N6)	A	+	+	+	+	+	+	+	+	
A/Equina/Praga/1/56 (H7N7)	+	+	+	+	+	+	> 6 400	+	+	
A/Equina/Miami/1/63 (H3N8)	> 6 400	> 6 400	> 6 400	> 6 400	> 6 400	> 6 400	+	> 6 400	> 6 400	
A/Duck/Memphis/546/74 (H11N9)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Leyenda: + negativo.

Las cepas *A/Gallinula chloropus cerceris/Cuba/6/82*, *A/Gallinula chloropus cerceris/Cuba/98/83* y *A/Fulica americana americana/Cuba/102/83*, se correspondieron de acuerdo con los títulos obtenidos con la hemaglutinina de la cepa marcadora *A/Hong Kong/1/68 (H3N2)*. Estas pueden ser recombinantes del grupo Hong Kong, que según *Lvov (1980)* y *Yancetoba (1980)*, es un fenómeno bastante frecuente en las cepas aisladas de aves.^{13,14}

La cepa *A/Aix sponsa/Cuba/15/82*, se identificó con una hemaglutinina H₇; sin embargo, esta hemaglutinina fue mucho más cercana a la cepa *A/FPV/Rostock (H7N1)* que a la *A/Equina/Praga/1/56 (H7N7)*, como se ve en la tabla 3.

En la tabla 4 se describieron los resultados del estudio del tipo de neuroaminidasa de las 9 cepas, sólo No. 15 mostró neuroaminidasa N₇ muy similar a *A/Equina/Praga/156 (H7N7)*; el resto de las cepas fueron identificadas como neuroaminidasa N₈, similar a *A/Equina/Miami/1/63 (H3N8)*.

Tabla 4. Reacción de la inhibición de la hemaglutinación con sueros hiperinmunes patrones para determinar la estructura de la hemaglutina del virus No. 15

Sueros hiperinmunes	A/Equina/Praga/1/56 (H7N7)	A/FPV/Duth/27 (H7N7)	A/FPV/Rostock/34 (H7N1)	A/Pavo/Inglaterra/63 (H7N3)
Virus 15	1 : 640	1 : 320	1 : 2560	1 : 40

En la tabla 5 se muestran los resultados del estudio de la estructura fina de estas cepas, que como se observó se estudiaron sólo 7 cepas con diferentes sueros monoclonales de los virus *A/Hong Kong/1/68*, *A/Equina/Miami/1/63* y *A/Pato/Ukrania/1/63*; debemos señalar que no fueron incluidos en el estudio las cepas *A/Gallinula chloropus cerceris/Cuba/98/83* y *A/Fulica americana americana/Cuba/102/83*, debido a que en el estudio de su estructura antigénica por los métodos convencionales no hubo duda de su similitud con la hemaglutinina H₃ de la *A/Hong Kong/1/68 (H3N2)*, y la cepa *A/Aix sponsa/Cuba/15/82* fue utilizada como control de estos aislamientos por poseer una hemaglutinina H₇.

Las cepas fueron enfrentadas para los clones 3, 19, 21, 24, 31, 63, 152 y 225 de *A/x — 31/Hong Kong/1/68* (recombinante de la Hong Kong), a las clonas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de *A/Equina/Miami/1/63 (H3N8)* y 5, 6 y 22 de *A/Pato/Ukrania/1/63 (H3N8)*.

Los resultados obtenidos con los antisueros monoclonales de *A/Pato/Ukrania/1/63* fueron negativos, así las cepas *A/Gallinula chloropus cerceris/Cuba/5/82*, *A/Gallinula chloropus cerceris/Cuba/7/82*, *A/Gallinula chloropus cerceris Cuba/8/82*, *A/Aix sponsa/Cuba/9/82* y *A/Aix Sponsa/Cuba/13/82*, que habían mostrado correspondencia con la hemaglutinina de *A/Pato/Ukrania/63 (H3N8)* que con la de *A/Hong Kong 1/68 (H3N2)* aparecen en el análisis de los antisueros monoclonales más cercanos a Hong Kong sin tener tampoco una absoluta correspondencia con Hong Kong, de acuerdo con los títulos obtenidos, ya que el más alto fue 3200 para el clon 19 de la cepa *A/Gallinula chloropus cerceris/Cuba/5/82*.

Tabla 5. Reacción de inhibición de la hemaglutinación con anticuerpos monoclonales para el estudio de la estructura fina de la hemaglutinina

Antígenos	A/X-31/Hong Kong/68								A/Equina/Miami/1/63 (H3N8)					A/Pato/Ukrania/1/63 (H3N8)			
	3	19	21	24	31	63	125	225	1	2	3	4	5	6	5	6	22
5	<	3 200	<	<	<			800	200	<	<	1 600	<	<	<	<	<
6	800	1 600	<	400				800	<	<	<	200	<	<	<	<	<
7	400	400	<	200				800	100	<	<	100	<	<	<	<	<
8	200	20	<	200				400	<	<	<	100	<	<	<	<	<
9	400	80	<	800				800	200	<	<	400	<	<	<	<	<
13	100	<	<	200				800	200	<	<	<	<	<	<	<	<
15	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
A/Hong Kong/1/68 (H3N2)	12 800	12800	6400	12800	3200	64 w	1 600	6400	3 200	400	6 400	12 800	800	6400	100	<	<
A/Equina/Miami/1/63 (H3N8)	<	<	<	<	<	<	<	<	6 400	100	800	400	400	1 600	<	<	<
A/Pato/Ukrania/1/63 (H3N8)	1 600	<	<	800	<	800	<	<	200	100	<	<	<	<	6400	6400	3200

El análisis hecho con los antisueros monoclonales demostró que estas cepas con recombinantes del Complejo Hong Kong, por lo que esto es compatible con los resultados obtenidos con anticuerpos monoclonales por **Yamnikova y Yancetoba**^{15,16}

CONCLUSIONES

1. Las cepas de virus de gripe **A** aisladas presentaron fórmulas antigénicas H3N8 ocho de ellas, y una H7N7.
2. Seis de las cepas aisladas fueron de aves endémicas y 3 de aves migratorias. Todo parece indicar que nuestra ortofauna desempeña una función importante en el mantenimiento de estos virus en la naturaleza.
3. Debido a que la zona estudiada constituye el paso de las corrientes migratorias del Norte y el Sur, la misma ofrece amplias posibilidades para el estudio de Ecología de la gripe en Cuba.

Agradecimiento

Este trabajo se ha realizado *gracias* a la *excelente* cooperación de *las compañeras* Aida Morales y Maritza Fernández. *También quisieramos* expresar nuestro reconocimiento *al colectivo del* laboratorio de virus respiratorios del **INHEM**, *especialmente* la *compañera* Olvido Díaz, a los compañeros del departamento de control de vectores y, en particular, a los siguientes compañeros: Freddie Villafaña, Giraldo I. Garcia, Raúl González y Carmen Marcos, de la Dirección de Flora y Fauna del **Ministerio de la Agricultura**.

SUMMARY

Savón C. et al. First report about isolation of influenza A *virus* from *wild birds* in Cuba.

One hundred migratory and autochthonous wild birds are hunted in the **Ciénaga** de Zapata Municipality, Matanzas Province. Nine isolations are obtained, for 9% positiveness. Of the isolations obtained, 8 corresponded to H3N8 antigenic formula, which were recombinants of Hong Kong complex: 1 corresponded to H7N7 antigenic formula, similar to strain A/Equine/Praha/1/56 (H7N7) on the basis of its neuroamidase and to strain A/FOV/Rostock/34 (H7N1) on the basis of its hemagglutinin.

RÉSUMÉ

Savón, C. et al. Premier rapport d'isolements du virus de la *grippe* A chez des *oiseaux sauvages* a Cuba.

On chasse 100 oiseaux sauvages autochtones et migratoires dans la province de Matanzas, Municipalité Ciénaga de Zapata. Il est obtenu 9 isolaments, ce qui représente 9% de positivité. Huit des isolaments correspondaient à la formule antigénique H3N8, et ils ont été des recombinants du complexe Hong Kong: l'autre correspond à la formule antigénique H7N7 similaire à la souche A/Equine/Prague/1/56 (H7N7) par sa neuroamidase, et par son hémagglutinine, à la souche A/FOV/Rostock/34 (H7N1).

BIBLIOGRAFIA

1. Kaplan, M.; R. Webster: The Epidemiology of Influenza. *Sci.* 237 (6): 88-106, Dec., 1975.
2. Beveridge, W. J. B.: Origen de las pandemias de gripe. *Crónica de la OMS* 29. Dec., 1975.

3. **Simposium Soviético-americano.** Alma **Atá**, 1980. **Vaprocí** *Virusology* 4: 504-506, **Moscú**, 1981.
4. **Goluber, D. B.;** *G. I. Karpukhin*; Anthoponus conception of the origen of epidemic strains of influenza A virus. *Transactions of the All-Union Research Institute of influenza.* Leningrad, 1982.
5. **Oropesa Fernandez, S. J.:** Estudio Serológico con **antígenos** de influenza en sueros de origen humano y animal. Tesis para optar por el título de especialista de I Grado en Microbiología. Ciudad de La Habana, 1977.
6. **Siderova, G. A.;** *V. P. Andreev*: Material de trabajo para el método de selección de pruebas para la investigación virológica de las aves en coionias. Instituto de **Virología "D.I. Ivanosky"** Academia de Ciencias **Médicas** de la URSS. **Moscú**, 1979.
7. **Goyenechea, Angel et al.:** **Diagnóstico rápido** de la Influenza humana por el método de **Inmunofluorescencia directa.** *Boletín Epidemiológico del INHEM*, Vol. 4, No. 17, sept. de 1982.
8. **Advanced Laboratory techniques for influenza diagnosis center for diseases control.** Atlanta, Jan., 1975.
9. **Garrido, O.;** *M. F. Garcia*: **Catálogo de las Aves de Cuba.** Academia de Ciencias de Cuba. La Habana, 1975.
10. **A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum.** *Bull WHO* 58 (4): 585-591, 1980.
11. **Laver, W. C.;** *R. C. Webster*: Antibodies to human influenza viruses neuroaminidase [the **A/Asian/1/57 H2N2** strain] in sera from Australian pelagic birds. *Bull WHO* 47 (4): 449-452 1972.
12. **Lancer, W. C.;** *R. C. Webster*: Studies on the origen of pandemic influenza viruses as possible progenitors of Hong Kong strain of human influenza. *Virology* 51; 2, 383-389, 1973.
13. **Zhansetova, M. T.:** **Aislamiento del virus de la gripe en los patos en Kazajastan y el estudio de algunas de sus propiedades biológicas,** *Vsb. Ecología de los virus de Kazajastan y Asia Central.* **Alma-Atá**, 1980. P. 94-98.
14. **Lvov, D. K.:** El papel de los biosenos en la conservación de los genofondos en el virus de la gripe. *Ecología de los virus,* **Moscú**, 1980. P. 5-10.
15. **Zhnsetova, M. T.:** Problemas de la causa de los virus del grupo BSB. *Ecología de los virus de Kazajastan y de Asia Central.* **Alma-At&** P. 53-60.
16. **Yamnikova, S. S. et al.:** Identification of influenza viruses using monoclonal antibodies. *Vopr Virusol* 4: 542-546, 1982.

Recibido: 13 de octubre de 1984
 Aprobado: 21 de diciembre de 1984

Lic. **Clara Savón**
 Instituto **Nacional** de Higiene, Epidemiología y **Microbiología**
Infanta 1158
 Ciudad de La Habana
Cuba