

COMPARACION ANTIGENICA POR PRUEBAS DE INHIBICION
DE LA HEMAGLUTINACION E INHIBICION DE LA
NEURAMINIDASA DE VIRUS HAV6N2 AISLADOS
DE ESPECIES AVIARES

Dorothy Gaskin de Pellacani*, Virginia Hinshaw**

** Cátedra de Virología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Apartado Postal 526. Maracaibo, Venezuela. ** Division of Virology, St. Jude Children's Research Hospital, P. O. Box 318, Memphis, Tennessee 38101, U.S.A.*

RESUMEN

Se efectuó una comparación antigénica entre 418 virus influenza A Hav6N2 aislados de muestras tomadas a patos salvajes del Canadá en 1978, demostrándose, por las pruebas de inhibición de la hemaglutinación, que estos virus están estrechamente relacionados, ya que todos reaccionaron siguiendo un mismo patrón; indicando así que sus hemaglutinantes eran similares. Comparándolos con otros virus Hav6, los resultados IH demostraron que este grupo de virus aislados de patos pueden diferenciarse de otros virus Hav6 aislados de pavos y otros patos, evidenciándose así que los cambios leves (drift) ocurren en los virus aviarios al igual que en los del hombre.

La neuraminidasa de los virus Hav6N2 estudiados se relacionaba con la neuraminidasa de la cepa humana A Jap/305/57 (H2N2), evidenciando que antígenos de cepas humanas viejas continúan circulando entre las aves.

Estos hallazgos indican que los virus aviarios pueden desempeñar un papel importante en la ecología de los virus influenza A, y al mismo tiempo intervenir en la aparición de nuevos virus en otras especies de animales y del hombre.

INTRODUCCION

Los virus influenza están ampliamente difundidos en la naturaleza (para revisión ver "The Influenza Viruses and Influenza", editado por E.D. Killbourne, 1975, N. Y. Academic Press). Hay tres tipos de virus influenza: el tipo A/ que afecta al hombre, mamífero inferiores y pájaros, y los tipos B y C que sólo se han encontrado infectando al hombre.

Los virus influenza A/ tienen simetría helicoidal y poseen un genoma de ARN compuesto de 8 segmentos. Su superficie externa está recubierta de una serie de prolongaciones de naturaleza glucoproteica que representan dos de sus antígenos de superficie: la hemaglutinina, responsable de la hemaglutinación, de la adherencia del virus a las células durante la infección, así como también de la formación de anticuerpos neutralizantes, los cuales protegen de subsecuentes infecciones con la cepa que les ha dado origen. El otro antígeno es la neuraminidasa, el cual permite la liberación del virus de las células infectadas, y por lo tanto facilita la diseminación viral de una célula a otra, pudiendo ser esta acción disminuída por los anticuerpos específicos.

A pesar de tenerse conocimientos del papel preventivo desempeñado por los anticuerpos contra la hemaglutinina y neuraminidasa en las infecciones a virus influenza, éstos siguen siendo la causa de las mayores pandemias observadas en el hombre debido a que tienen la capacidad de experimentar cambios tanto en la hemaglutinina como en la neuraminidasa, revistiendo la forma de cambios leves (drift) o bien radicales (shift) (9). Los cambios leves son pequeñas y graduadas alteraciones de la hemaglutinina que hacen al virus diferente de la cepa previa, pero conservan su tipo original; así por ejemplo, los virus A/Victoria 75 y A/Texas 77 pertenecen al subtipo H3N2, sin embargo, son antigénicamente diferenciables uno del otro. Este tipo de cambio ocurre en períodos interpandémicos. Los cambios radicales (shift) involucran alteraciones mayores en una o ambas proteínas antigénicas; este hecho condiciona la aparición de las ya mencionadas pandemias pues la población carece de anticuerpos contra el nuevo virus.

El mecanismo por el cual surge esta nueva cepa viral no se conoce, existiendo al respecto varios postulados; así: Webster y Lever, 1975 (9) sugieren que aparecen por recombinación genética entre cepas humanas y

otras provenientes de animales, basándose en la particularidad que tienen estos virus de recombinarse o intercambiar su material genético cuando dos virus diferentes infectan una misma célula, pudiendo recombinarse en 64 formas gracias a la segmentación del genoma viral. Estudios realizados desde el punto de vista antigénico (9) y genético (7, 8) han demostrado que la hemaglutinina del virus Asiático humano H2N2 1957, y la del virus Hong Kong, también humano, H3N2 1968, han podido originarse de un virus aviario. Tomando ésto en cuenta se han conducido estudios intensivos para determinar los virus presentes en las aves e igualmente dilucidar su posible intervención en el origen de algunas cepas humanas.

Los virus influenza pueden infectar tanto aves domésticas como aves salvajes migratorias (3); de estas últimas fueron aisladas por primera vez en 1961 (2). En estudios realizados en los dos últimos años en patos congregados en el Canadá en época previa a su migración, se ha demostrado una alta incidencia de virus influenza (4, 5), los cuales, en base a 10 subtipos de hemaglutininas y todas las neuraminidasas conocidas se presentan en diferentes formas de combinación; lo que no sucede en el hombre en el cual circula un solo subtipo antigénico, ya que el subtipo precedente desaparece completamente al surgir uno nuevo. Es de hacer notar así mismo, que algunos subtipos de virus aislados de patos poseen antígenos de superficie que presentan estrechas relaciones con otros virus aislados del hombre y otros mamíferos, así, el virus aviario Hav7 guarda relación con los virus H3 humanos; el H2 humano y aviario igualmente son antigénicamente muy similares; de reciente comprobación son las relaciones entre los diferentes virus Hsw1n1 porcinos, humanos y aviarios. Estos hallazgos sugieren que las aves migratorias representan el reservorio ideal para los virus influenza en la naturaleza, si se toman en cuenta ciertas características muy especiales de las infecciones virales que en ellas se producen y que han sido discutidas en otras oportunidades (4, 5, 10) como son: 1.— Que el virus se replica principalmente en el tracto intestinal de las aves 2.— Los pájaros infectados no sufren de enfermedad ni sintomatología alguna debido a la infección viral. 3.— El virus es excretado por las heces. 4.— El virus se puede aislar del agua de los lagos y pantanos donde viven, indicando que el agua contaminada puede ser el medio de trasmisión en la naturaleza.

Sumadas estas eventualidades el hecho de su migración periódica, ocurre que poseen tanto los virus como el medio de trasmisión para trasladar las infecciones virales a largas distancias y aún a otras especies de animales.

En 1978, se estudió la población de patos congregados en el Canadá y de ellos se aisló un considerable número de virus influenza aviario Hav6N2. Igualmente entre los años 1976 - 1978, se encontró al virus Hav6 respon-

sable de algunos brotes epidémicos observados en pavos de cría en Minnesota, inculpándose a las aves migratorias de trasladar e introducir la infección viral entre las especies domésticas (3). Por lo tanto se hicieron estudios antigénicos comparativos con los virus Hav6 provenientes de patos y pavos encontrando que el virus de los patos era diferente del de los pavos de cría de Minnesota (Hinshaw, datos no publicados). En consecuencia surge una nueva pregunta ¿son todos los virus Hav6N2 que circulan entre los patos antigénicamente iguales? ¿o habrá entre ellos variantes productos de los cambios antigénicos leves y graduales? Este fenómeno (drift) ya ha sido demostrado para los virus influenza humanos y porcinos, y solo recientemente Hinshaw y colaboradores (en prensa) reportan la incidencia de cambios leves (drift) entre los virus influenza aviarios.

Con el fin de estudiar más a fondo los datos obtenidos, comparamos en este trabajo desde el punto de vista antigénico por medio de las pruebas de inhibición de la hemaglutinación e inhibición de la neuraminidasa, la gran mayoría de los virus Hav6N2 aislados de patos salvajes en 1978, para determinar si representaban un solo subtipo circulando entre la población aviaria o si existían numerosas variantes de ese subtipo. Además, estos virus fueron comparados con cepas de otras especies.

MATERIAL Y METODOS

La recolección de muestras y aislamientos virales han sido previamente descritas (4, 5). Durante el año 1978, se tomaron 1.800 muestras traqueales a patos salvajes de Canadá, aislándose 861 virus influenza de los cuales 523 fueron clasificados como Hav6N2, y de éstos se utilizaron 418 en nuestra investigación.

Clasificación antigénica.

Esta se efectuó por medio de las reacciones de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación, efectuándose en placas para microtitulación utilizando sueros previamente tratados con EDR. La titulación de la neuraminidasa e inhibición de la neuraminidasa se efectuó según las recomendaciones de O.M.S., 1973 (11).

Antisueros.

Los virus influenza aislados de los patos fueron inicialmente clasificados utilizando para ellos suero hiperinmune de cabra anti-hemaglutinina y anti-neuraminidasa de subtipo de referencia (4), y los antisueros utilizados en este tratamiento fueron preparados en pollos, según método ya descrito en 1975 (6).

Los siguientes virus influenza A fueron utilizados: 418 virus Hav6N2 aislados de patos salvajes de Canadá durante el año 1978, y los virus que se especifican en las tablas I y II.

RESULTADOS

Caracterización antigénica de la Hemaglutinina.

Los resultados de la prueba de inhibición de la hemaglutinación practicada a los 418 virus Hav6N2 aislados de patos en 1978, indicaron que existen estrechas relaciones entre ellas. Usando la misma prueba se les comparó con un panel de anticuerpos (Tabla I), que comprende virus Hav6 aislados en los últimos 12 años, obteniéndose patrones similares de reactividad para los 418 virus Hav6N2 examinados, demostrando que había una sola variante circulando.

Esta variante DK/Alb/133/78 (Hav6N2), patrón hemaglutinante de las 418 muestras examinadas, demostró ser antigénicamente muy similar a los virus aislados de patos en Canadá en 1977 DK/Can/77 (Hav6N2), y sin ser idénticos guardan un parecido con el virus Ty/Mass/66 (Hav6N2). Como contraste, los virus aislados de pavos en Minnessotta en 1978 Ty/Mn/525/78 (Hav6N1) y los aislados de patos en Okhaloma en 1977 DK/OK/7/77 (Hav6N2) se diferencian fácilmente de los virus aislados de patos canadienses en 1977-78; exhibiendo por el contrario, patrones de reactividad en IH, parecidos al de los virus aislados de patos en Australia (Shearwater/Aust/72) (Hav6Nav5) y los aislados en Pennsylvania (Duck/Penn/69) (Hav6N1).

Es conocido que el antisuero de pollo produce cierto grado de inhibición estérica en la prueba de IH; sin embargo, los resultados con virus Hav6 que poseen diferentes neuraminidasa por ejemplo: Shearwater/Aust/77 (Hav6Nav5), y DK/OK/7/77 (Hav6N2) mostraron igual reactividad en las pruebas practicadas con antisuero de pollo y suero hiperinmune de conejo (resultados no mostrados). Por lo tanto, parece que los anticuerpos contra la neuraminidasa no influyeron notablemente en los resultados.

Caracterización antigénica de la Neuraminidasa.

Para comprobar si la neuraminidasa de los diferentes virus de aves y humanos tenían relaciones entre sí, se compararon varios virus (Tabla II). En ella podemos ver que los resultados muestran reacciones de los 4 virus aviarios con la cepa humana Jap/305/57 (H2N2). Los títulos están todos en un rango de 8 títulos, indicando que estos virus están estrechamente relacionados por su neuraminidasa.

TABLA I

REACCION DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTININACION DE VIRUS HAV6
DE DIFERENTES FUENTES

Virus	Antisuero y Títulos IH(1) obtenidos					
	Ty/Mass/66	Shearwater/Aust/72	DK/Alb/133/78	Ty/Mm/525/78	DK/NY/59/78	DK/NY/59/78
Ty/Mass/66 (Hav6N2)	640	80	80	< 40	< 40	80
DK/Penn/69 (Hav6N1)	80	320	< 40	640	640	40
Shearwater/Aust/72 (Hav6Nav5)	80	320	< 40	640	640	20
DK/OK/7/77 (Hav6N2)	160	640	80	640	640	40
DK/Can/77 (Hav6N2)	160	< 40	80	< 40	< 40	320
Ty/Mm/525/78 (Hav6N1)	80	320	< 40	640	640	40
DK/Alb/133/78 (2) (Hav6N2)	320	40	160	40	640	640
DK/Alb/310/78 (Hav6N2)	160	40	160	40	40	320
DK/Alb/265/78 (Hav6N2)	320	40	320	40	40	320
Dom DK/NY/59/78 (Hav6N2)	80	<40	80	40	40	320

(1) Los títulos IH equivalen a la recíproca de la más alta dilución de suero que inhiben 4 dosis hemaglutinantes de virus.

(2) Esta muestra representa a los virus aislados de patos Canadienses en 1978, y que reaccionaron en igual forma.

TABLA II
COMPARACION ANTIGENICA POR MEDIO DE LA PRUEBA DE INHIBICION
DE LA NEURAMINIDASA DE VIRUS HUMANOS Y DE PATOS QUE POSEEN NEURAMINIDASA N2

Antisueros de pollos (a)	Virus y títulos inhibidores de la neuraminidasa (b)					
	Jap/305/57 (H2N2)	Pintial/Alb/133/78 (Hav6N2)	DK/Alb/23/78 (Hav6N2)	DK/Alb/57/76 (Hav5N2)	Dom DK/NY/59/78 (Hav6N2)	
Jap/305/57	1500	1500	700	200	700	
Pintial/Alb/133/78	400	800	200	600	1000	
DK/Alb/57/76	1500	1000	400	500	200	
Dom DK/NY/59/78	400	--	200	200	800	

(a) El antisuero fué preparado en pollos como se describe en Material y Métodos.

(b) Los valores presentan la recíproca de la dilución de suero que produce el 50% de inhibición de la neuraminidasa viral dando una densidad óptica aproximadamente de 0.5.

DISCUSION

Las diversas comparaciones de la hemaglutinina Hav6 y la neuraminidasa N2 de las diferentes cepas de virus de aves indican que los cambios leves (drift) se suceden en la hemaglutinina de un subtipo viral aviario, al igual que en las cepas humanas, y que variantes de un subtipo coinciden circulando entre las aves donde se mantienen por largos períodos de tiempo. Particular significación tienen los virus que poseen antígenos de superficie relacionados con los del hombre; es el caso de los virus N2 que se han mantenido relativamente estables circulando entre los patos con características similares a las cepas N2 humanas, indicando que los antígenos de origen humano son mantenidos en los virus aviarios.

Como antes mencionamos, existen evidencias de que las aves migratorias transportan sus virus a las especies domésticas, siendo responsables de los brotes que en ellas surgen (3); esta posibilidad existe especialmente si consideramos el gran número de patos afectados de influenza en Canadá. Por otra parte, los virus aislados de los brotes observados en aves domésticas se relacionan con los virus presentes en patos salvajes (1, 3, 4). En el caso de los virus Hav6 que coincidieron el mismo año en patos salvajes y pavos de cría en Minnessotta, siendo antigénicamente diferentes, existe la posibilidad de que no tuvieran un origen común proviniendo el de los pavos posiblemente de otro grupo de patos salvajes migratorios de Canadá portadores de un virus Hav6N1. De todas formas, es muy probable que estas aves migratorias sean la fuente de infección para las especies domésticas, ya que estudios de infectividad con virus aislados de los patos salvajes, demuestran que poseen poder potencial para replicarse en otras especies: pollos, pavos, patos y aún en ciertos mamíferos como cerdos (Hinshaw, en prensa). Estos datos sugieren la posibilidad de que las cepas de influenza aviaria pueden desempeñar importante papel en la aparición de infecciones virales en otras especies.

La circulación de virus influenza A en patos salvajes nos indica que representan un vasto reservorio de virus en la naturaleza. Su situación es ideal para transportar y transmitir virus incluyendo cepas que guardan similitud con las humanas y otros mamíferos, y puede muy bien ser que los virus aviarios formen parte de la cadena ecológica de los virus influenza A en la naturaleza.

El estudio de estos virus nos provee de un sistema modelo aplicable a los virus influenza humanos permitiéndonos estudiarlos y conocerlos mejor. Al mismo tiempo podemos dilucidar en forma definitiva, la intervención de las cepas aviarias en la aparición de nuevas cepas en otras especies y sobre todo en el hombre.

ABSTRACT

Antigenic characterization of virus Hav6N2 isolated from avian species by hemagglutination - inhibition and neuraminidase inhibition tests. *Gaskin - Pellacani D. (Cátedra de Virología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado Postal 526, Maracaibo, Venezuela), Hinshaw V. Invest Clín 22(1): 43-52, 1981.*— Antigenic comparisons between 418 Hav6N2 influenza A viruses isolated from feral ducks in Canada in 1978 showed that these duck viruses were very closely related. In hemagglutination-inhibition tests, the duck viruses showed similar reactivity patterns, indicating that the hemagglutinins were very similar. In comparisons with other Hav6 viruses, the HI results showed that the duck viruses could be distinguished from Hav6 viruses from turkeys and other ducks, indicating that antigenic drift occurs in the avian viruses, as in human strains. The neuraminidase of the Hav6N2 viruses were very closely related to the neuraminidase of the human strains, A/Jap/305/57 (H2N2), showing that antigens of old human strains continue to circulate in the avian species. These findings indicate that the avian may be quite important in the ecology of influenza A viruses and may well play a role in the appearance of new viruses in other species, including humans.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— BEARD CW, HELFER DH: Isolation of two turkey influenza viruses in Oregon. *Avian Dis* 16: 1133-1136, 1972.
- 2— BECKER WG: The isolation and classification of tern virus: Influenza virus A/tern/South Africa/1961. *J Hyg* 64: 309, 1966.
- 3— EASTERDAY BC: Animal influenza. In: *The Influenza Viruses and Influenza*. pp. 462-463. Kilbourne ED, ed. Academic Press, New York, 1975.
- 4— HINSHAW VS, WEBSTER RG, TURNER B: Novel influenza A viruses isolated from Canadian feral ducks: Including strains antigenically related to swine influenza (Hsw1N1) viruses. *J Gen Virol* 41: 115-127, 1978.
- 5— HINSHAW VS, WEBSTER RG, TURNER B: Waterborne transmission of influenza A viruses. *Intervirology* 11: 66-68, 1979.
- 6— PALMER DF, COLEMAN MT, DOWDLE WR, SCHILD GC: *Advanced Laboratory Techniques for Influenza Diagnosis*. U.S. Dept. of Health Education and Welfare. Immunology Series N° 6, 1975.

- 7- SCHOLTISSEK C, VON HOYNINGEN V, ROTT R: Genetic relatedness between the new 1977 epidemic strains (H1N1) of influenza strains isolated between 1947 and 1957 (H1N1). *Virology* 89: 613-717, 1978.
 - 8- SCHOLTISSEK C, ROHDE W, VON HOYNINGEN V, ROTT R: On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 87: 13-20, 1978.
 - 9- WEBSTER RG, LAVER WG: Antigenic variations of influenza viruses. In: *The Influenza Viruses and Influenza*. pp. 209-314, Kilbourne, ED, ed. Academic Press. New York, 1975.
 - 10- WEBSTER RG, YAKNO M, HINSHAW VS, BEAN WJ, MURTI KG: Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84: 268-278, 1978.
 - 11- WHO Report: Influenza neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. *Bulletin of the World Health Organization* 48: 199-203, 1973.
-