

VIRUS DE INFLUENZA A EN ANIMALES DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN CUBA

Autores principales: Lester Josué Pérez Rodríguez¹ y Carmen Laura Perera González

Otros autores: Armando Vega, Liani Coronado, María Teresa Frías, Ana María Acevedo, Liliam Ríos y Damarys Relova

Colaboradores: Dagmar Rouseaux, Lillianne Ganges, José Ignacio Núñez

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. Apdo. 10. San José de las Lajas. Mayabeque. Teléfono 047-849133 Fax: 047-861104

¹Autor de correspondencia. Correo electrónico: lesterjosue@censa.edu.cu

Lester Josué Pérez (20%). Realizó el diseño experimental, el procesamiento bioinformático, el análisis e interpretación de los resultados obtenidos y preparó los manuscritos para publicación.

Carmen L. Perera (20%). Realizó el diseño experimental, el procesamiento bioinformático, el análisis e interpretación de los resultados obtenidos y preparó los manuscritos para publicación.

Armando Vega (15%). Contribuyó de forma decisiva en el diseño y trabajo experimental. Participó en el análisis de los resultados y el aislamiento de los virus de influenza pandémica.

Liani Coronado (10%). Contribuyó en la evaluación experimental y conformación del documento.

Liliam Ríos (10%) Contribuyó en la en la evaluación experimental y conformación del documento.

María Teresa Frías (10%). Contribuyó en la selección y colección de las muestras de interés.

Ana M. Acevedo (10%). Contribuyó al diseño y al procesamiento bioinformático, realizó la evaluación experimental de los controles positivos para el virus de influenza aviar.

Damarys Relova (5%). Contribuyó en la selección y colección de las muestras de interés.

RESUMEN

El aumento de la diversidad entre las cepas del subtipo H5 del virus de influenza aviar ha dado como resultado la necesidad de desarrollar nuevos ensayos moleculares sensibles y específicos. En este estudio, se desarrolló un ensayo de transcripción inversa acoplada a una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real basado en SYBR-Green I para la detección de virus de influenza aviar subtipo H5. El análisis de secuencia del nuevo linaje emergente en México de aislados H5N2 (subgrupo B) reveló varios errores en la hibridación de los cebadores y sondas de hidrólisis informado en los ensayos de PCR en tiempo real propuestos por los diferentes laboratorios de referencia de la OIE (Padova, Italia; Ames Iowa, Estado Unidos de América; Weybridge, Reino Unido) para el linaje americano. El ensayo descrito en el presente trabajo se diseñó para resolver este escape por parte de los virus circulantes de este nuevo linaje del subtipo B. Este ensayo de PCR en tiempo real detecta con éxito una gama de diferentes cepas de influenza aviar de subtipo H5 de ambos linajes norteamericanos y euroasiáticos, así como diferentes cepas del subtipo H5 de diferentes clades relacionadas con diversas ubicaciones geográficas. La sensibilidad del presente método se determinó por el uso de ARN in vitro transcritos y diluciones seriadas en base 10 de las dosis infectivas del agente tanto para virus del linaje americano como euroasiático. Se obtuvieron niveles de sensibilidad, con límites de detección de dosis infectiva media en embrión de pollo (EID50) / ml y número de copias 4,2 EID50/ copias/ml de genes. Los rangos lineales del ensayo estuvieron dentro 10⁶-10¹⁰ copias del gen y para las dosis infectivas EID50/mL. Los resultados obtenidos a partir de este método se compararon directamente con los ensayos de RT-PCR en tiempo real para la detección del subtipo H5 de influenza aviar recomendados por la OIE. La comparación se realizó con 110 muestras de exudados traqueales y cloacales de diferentes especies de aves colectadas durante investigaciones de campo y de laboratorio en Eurasia y África entre los años 2006-2008 y mostró 100% de concordancia. Finalmente el ensayo desarrollado se recomienda como un método alternativo, el cual permite además la detección en un enfoque de "doble control", que se utiliza principalmente en caso de un brote con mayor riesgo de las infecciones de aves de corral por virus H5 de América Central y el Caribe.

Por otra parte la emergencia del nuevo virus de influenza H1N1/2009 pandémico significa un problema global a la salud animal y humana. En el presente trabajo se realizó la vigilancia del virus H1N1/2009 pandémico en rebaños porcinos en Cuba, para determinar si este virus circulaba entre las poblaciones porcinas del país. Como resultado del presente trabajo se describe por primera vez la detección del virus H1N1/2009 pandémico en rebaños porcinos en Cuba, se realizó además, la caracterización molecular del genoma completo y el análisis filogenéticos de tres aislados virales de estos virus obtenidos. Las relaciones filogenéticas confirmaron que los ocho genes de estos tres aislados se derivan del virus H1N1/2009 pandémico. Diferentes marcadores moleculares relacionados con evolución adaptativa, evasión viral de la respuesta inmune del hospedero, virulencia y diseminación se encontraron en los aislados H1N1/2009 cubanos.

COMUNICACIÓN CORTA

La influenza aviar (IA) es una enfermedad causada por el virus de la influenza tipo A, un miembro de la familia Orthomyxoviridae que representa uno de los las mayores preocupaciones tanto para la salud humana como para la salud animal (Capua y Alexander, 2006). Los virus que afectan a las aves de corral se pueden separar generalmente según su patogenicidad. Los virus de influenza aviar altamente patógena (IAAP) (OIE, 2008a) producen enfermedades graves en las aves de corral, principalmente pollos y pavos causando pérdidas económicas devastadoras. Por su parte la influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) causa poca morbilidad y mortalidad (Capua y Alexander, 2006). Los virus IAAP que afectan a las aves de corral se han limitado a los subtipos H5 y H7, aunque no todos los virus de estos subtipos causan gripe aviar (OIE, 2008a). Por otra parte, hay un gran riesgo para los subtipos H5 y H7 de baja patogenicidad puedan convertirse en virus de altamente patógenicidad. Por consiguiente, tanto brotes en aves causados por virus IABP y IAAP de los subtipos H5 y H7 son enfermedades de declaración obligatoria a la OIE (OIE, 2008b). Por lo tanto, es esencial identificar cualquier virus de influenza aviar de los subtipos H5 o H7 en brotes de a través de los programas de vigilancia (Alexander, 2007).

Por otra parte, en el humano se han sucedido varias pandemias causadas por este agente viral (Neuman y col., 2009). La primera de ellas, de las que se tienen datos recopilados, fue la de 1918/1919 causada por un virus del subtipo H1N1, esta pandemia conocida también como "*Spanish-flu*" ocasionó cerca de 50 millones de muertes entre las tres oleadas de la enfermedad primavera/1918, invierno/1918 y primavera/1919 (Kobasa y col., 2007). En 1957 otra pandemia llamada "*Asian-influenza*", se originó en el sur de China en Febrero de 1957 la cual se diseminó por varios países asiáticos, al Reino Unido y Estados Unidos en Octubre de ese mismo año. Esta pandemia fue originada por un virus pseudo-recombinante de origen aviar/humano el cual contenía los segmentos PB1, HA y NA de origen aviar del subtipo H2N2 y el resto de los segmentos del H1N1 provenientes de la "*Spanish-flu*", por lo que este virus era un doble pseudorecombinante (doble-*ressortant* del inglés). En 1968 el subtipo H2N2 se reemplazó por un nuevo virus pseudorecombinante de origen aviar/humano que poseía la HA del subtipo H3 aviar y contenía además el segmento PB1, así este nuevo virus poseía los segmentos PB1 y HA del subtipo H3 aviar, la N2 del anterior doble reassortant H2N2 y el resto de los segmentos del H1N1 humano, este nuevo virus se ha quedado establecido como el linaje H3N2 en humanos (Neuman y col., 2009). Aún sin causar episodios pandémicos, otros subtipos del virus de *Influenza A* como H7N7, H9N2 y H5N1 también han afectado al humano en brotes esporádicos (Fenner, 2011). En abril de 2009, se identificó un nuevo virus de influenza H1N1 de origen porcino que circulaba en los seres humanos y rápidamente alcanzó la magnitud de pandemia (Neumann y col., 2009). El nuevo virus de influenza H1N1/2009 emergente, contenía segmentos de genes ancestrales del triple *reassortant* que había circulado en cerdos (H3N2) en América del Norte desde finales de 1990 de origen humano, del H1N1 clásico de

cerdos y los segmentos de los genes (NA y M) del virus porcino de América del Norte fueron además reemplazados por los respectivos segmentos del virus porcino euroasiático de origen aviar (Garten y col., 2009; Smith y col., 2009). Por primera vez el mundo se enfrentaba a un virus que contenía genes de tres especies diferentes y los dos hemisferios (Capua y Cattoli, 2010).

Un ensayo de real time RT-PCR basado en SYBR Green para la detección del gen de la hemaglutinina de virus del subtipo H5 de influenza aviar

En el presente estudio el análisis de secuencias para el ensayo comúnmente empleado para la detección del subtipo H5 del linaje americano reveló varios puntos de falsas hibridaciones en el reconocimiento de cebadores y sondas a la secuencia diana para un subconjunto de estas secuencias. Por otra parte, la evaluación "*in silico*" de los cebadores mostró que este subconjunto de los virus es probable que no sean detectados por el ensayo, probablemente a causa de los errores de apareamiento de bases especialmente hacia el extremo 3' del cebador y las secuencias virales. De ahí que en este trabajo se haya desarrollado un ensayo de rRT-PCR novedoso basado en SYBR-Green como un método rápido y sensible sobre todo para la detección del subtipo H5 del linaje americano. El nuevo método detectó con éxito una gran variedad de diferentes virus de influenza aviar del subtipo H5 que incluyeron virus contemporáneos de diversas ubicaciones geográficas. El ensayo de rRT-PCR actual resultó ser altamente específico, sensible y reproducible. Detectó con éxito una gama de cepas del virus del subtipo H5, tanto de Eurasia y del linaje americano que circulan actualmente en Europa, África y América en las aves de corral y las aves acuáticas como se predijo por la evaluación "*in silico*", mientras que no se obtuvieron resultados positivos con cualquiera de los otros subtipos de cepas virales de IA y las principales patógenos aviares diferentes a influenza.

La idoneidad del ensayo de rRT-PCR se describe en el presente estudio como una herramienta de diagnóstico para detectar rápidamente virus del subtipo H5 IA. Esto se confirmó por los resultados obtenidos con el empleo de 110 clínica muestras de diferentes especies de aves recogidas durante campo y investigaciones de laboratorio en Eurasia y África en 2006-2008. En cuanto a la sensibilidad analítica y el rango dinámico los datos obtenidos fueron comparables o incluso superiores a los resultados reportados por protocolos de rRT-PCR comúnmente usados, basado en sondas de hidrólisis (Spackman y col., 2002; Slomka y col., 2007; Monne y col., 2008; Slomka y col., 2009). Debido a la alta frecuencia de mutaciones del virus de IA y de la heterogeneidad de las cepas circulantes, es posible que las mutaciones en las regiones donde hibridan los cebadores o sonda pueden reducir la sensibilidad del ensayo y llevar a resultados negativos falsos.

Los virus de influenza H5N2 de baja patogenicidad que circulan en México, América Central y República Dominicana siguen siendo una verdadera amenaza para los países vecinos. En particular, el linaje mexicano (Subgrupo B) ha

demostrado su potencial de propagación transfronteriza. El linaje mexicano de H5N2 se extendió a países vecinos como Guatemala y El Salvador, a pesar de los programas de vacunación masiva (Lee y col., 2004). En 2005, Japón registró un brote de H5N2 de baja patogenicidad y el virus causante se encontró que estaba más estrechamente relacionado con el virus aislado de Guatemala (Ozawa y col., 2006; Okamatsu y col., 2007). También el aislamiento de un IABP H5N2 virus de linaje mexicano de un loro en los EE.UU genera dudas en cuanto a su potencial de patogenicidad y transmisión entre las aves domésticas (Hawkins y col., 2006; Pillai y col., 2004). Para superar el reto que estos virus representan para el diagnóstico molecular el presente ensayo ha sido diseñado para detectar todos los de América del Norte IA H5 a partir de todas las secuencias publicadas en el GenBank que incluyen los virus de baja patogenicidad H5N2 de linaje mexicano.

En conclusión, el presente ensayo de rRT-PCR basado en SYBR Green puede proporcionar la detección específica, así como una rápida y sensibles cuantificación de virus de influenza aviar de subtipo H5 para la rápida identificación de los brotes y programas de vigilancia sobre todo en escenarios con mayor riesgo de infecciones de aves de corral en Centroamérica y el Caribe para este subtipo viral.

Aislamiento y caracterización molecular del virus de influenza H1N1/pandémico en rebaños porcinos de Cuba”. Determinación del estatus de infección por H1N1/2009 pandémico de cerdos en rebaños porcinos de Cuba, la diversidad y evolución genéticas de las poblaciones del virus así como, las *firmas moleculares* desarrolladas por el virus bajo condiciones insulares de carencia de flujo genético.

En noviembre de 2010, dentro del marco de un proyecto financiado por la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO de sus siglas en inglés) (Proyecto: TCP/RLA/3206, 2010) se muestrearon un total de 194 animales de 16 granjas de diferentes regiones de Cuba. De los mismos se tomaron muestras de exudado nasal (157 muestras) y muestras de pulmón de aquellos animales que se sacrificaron (81 muestras) para un total de 238 muestras analizadas. Los animales se seleccionaron por la presencia de signos clínicos compatibles con un cuadro respiratorio (tos, estornudos, secreción nasal, dificultad para respirar y disminución del apetito). Las muestras de tejido se tomaron solo de aquellos animales que mostraron lesiones compatible con neumonía intersticial no purulenta y las granjas seleccionadas todas fueron del sector tecnificado.

Un total de 24 de las 238 muestras (10,1%) arrojaron resultados positivos a la presencia del genoma de influenza A/H1N1 pandémico, que fue detectado mediante los ensayos RT-PCR en tiempo real propuestos como estrategia por OFFLU para la detección de este agente viral. El virus fue detectado así en seis de las 16 (37,5%) granjas porcinas evaluadas a lo largo de todo el país y se logró el aislamiento viral de tres de las muestras positivas. El análisis filogenético mostró que los ocho genes de los tres aislados cubanos se agrupan junto a virus

H1N1/2009 pandémicos. Los resultados revelaron que todas las secuencias de cada gen individual de los aislados cubanos, con la excepción de la HA, formaron un grupo definido independiente.

Las relaciones filogenéticas confirmaron que los ocho genes de los tres aislados que se obtuvieron, se derivan del virus de influenza H1N1/2009 pandémica. La caracterización molecular de los aislados cubanos evidenció para el gen de la HA la mutación G222D encontrada en el aislado A/swine/Holguín/121/2010, la cual se reportó recientemente en Canadá como evidencia de evolución adaptativa del virus de la influenza H1N1/2009 pandémica (Graham y col., 2011). Por lo que se podría sugerir que este aislado podría aumentar su eficiencia replicativa y convertirse en una variante dominante (Domingo, 2010). En los sitios antigénicos de HA1 (CB, SB, SA, y Ca) también se encontraron varias mutaciones. La glicosilación en la posición 162 ha sido relacionada con un bloqueo de la actividad neutralizante de los anticuerpos (Das y col., 2010). Este sitio potencial de glicosilación se encontró en el aislado cubano A/swine/Villa Clara/84/2010, así como en el nuevo virus triple recombinante del virus de influenza H1N1 porcina recientemente reportado en China (Xu y col., 2011). Por lo tanto, estas cepas virales podrían tener una habilidad adicional para escapar de la respuesta inmune del hospedero. A pesar de las mutaciones encontradas en diferentes secuencias de la NA de los aislados cubanos, las mutaciones H275Y y N295S vinculados con la resistencia al antiviral oseltamivir, no estaban presentes en las cepas cubanas. Por otro lado, la sustitución de un residuo de asparagina por uno de serina en la posición 31 (N31S), se observó en la proteína M2 de los tres aislados cubanos, dicha mutación está implicada en la resistencia de esta proteína a los fármacos anti-influenza, amantadina y rimantadina. Lo que sugiere que estas cepas son resistentes a estos medicamentos anti-influenza (Deyde y col., 2010).

El presente estudio demuestra una amplia presencia del virus de influenza H1N1/2009 pandémico en poblaciones porcinas cubanas. Las relaciones filogenéticas, sobre la base de la caracterización genómica completa, confirmó que los ocho genes de los tres aislamientos fueron derivados del virus pandémico. La condición insular de Cuba podría haber facilitado además las divergencias de los aislados cubanos relacionados con la pandemia de influenza H1N1/2009virus del resto de la palabra. Diferentes marcadores moleculares, previamente descrito en virus pandémicos H1N1/2009, relacionados con evolución adaptativa, la evasión viral de la respuesta del huésped inmune, virulencia y difusión también estuvieron presentes en los aislados del virus H1N1/2009 pandémico cubanos.

Referencias bibliográficas

- (1) Pérez LJ, Perera CL, Vega A, Frías MT, Rouseaux D, Ganges L, Nuñez JI, Díaz de Arce H. 2013. Isolation and complete genomic characterization of pandemic H1N1/2009 influenza viruses from Cuban swine herds. *Research in Veterinary Science*. 94, 781-788

- (2) Pérez LJ, Díaz de Arce H, Cilloni F, Salviato A, Marciano S, Perera CL, Salomoni A, Beato, Romero A, Capua I, Cattoli G. 2012. A SYBR Green-based Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of H5 Hemagglutinin Subtype Avian Influenza Virus. *Molecular and Cellular Probes*, 26, 137-145.
- (3) Vega A., Carmen L. Perera, Heidy Díaz de Arce, María T. Frías y Pérez L.J. 2012. Aislamiento de virus influenza porcina en Cuba. *Rev. Salud Anim.* Vol. 34 No. 2 (2012): 127-130
- (4) Acevedo A, Santana E, Díaz de Arce, H, L.J. Pérez, A. Caballero, L. Suárez y O. Sánchez. 2009 Desarrollo de controles positivos para métodos moleculares de detección de virus de la influenza aviar. *Rev Salud Anim.* v.31 n.1

La novedad de la presente propuesta recae en diferentes aspectos:

1. Se desarrolló, optimizó y evaluó un ensayo de RT-PCR en tiempo real capaz de detectar las nuevas cepas emergentes del subtipo H5 de influenza aviar que escapaban a los ensayos descritos por los Laboratorios de Referencia para Influenza Aviar de la OIE
2. El estudio actual demostró la presencia y diseminación del virus de influenza H1N1/2009 pandémica en poblaciones porcinas cubanas.
3. Las relaciones filogenéticas, basadas en la caracterización completa del genoma, confirmaron que los ocho genes de los tres aislados cubanos se derivan del virus de influenza H1N1/2009 pandémico pero más divergentes con relación a los virus de influenza H1N1/2009 pandémica del resto del mundo.
4. Los aislados cubanos de influenza H1N1/2009 pandémica poseen diferentes marcadores moleculares relacionados con la evolución adaptativa, la evasión de la respuesta inmune del hospedero e incremento en la virulencia.

La importancia práctica del trabajo radica en que:

1. Se dispone de una herramienta que permite la detección del virus de influenza subtipo H5, como una fortaleza en el diagnóstico de enfermedades exóticas, ante la sospecha de un brote por este subtipo viral en la avicultura en Cuba.
2. Se disponen de aislados del virus H1N1 pandémico que constituyen un material valioso para el desarrollo de ensayos diagnóstico que permitan diferenciar este tipo de aislados de otros que pertenecen al grupo de H1N1 clásico del cerdo.
3. Con los resultados obtenidos de la caracterización molecular de los aislados H1N1 pandémico es posible trazar estrategias de control en caso de una reinfección en humanos ya que se conoce que las cepas que circulan en cerdo de

este virus son sensibles al oseltamivir de ahí que de ocurrir una reinfección en humanos (trabajadores de granjas como principal grupo de riesgo) se puede conocer que el tratamiento con este antiviral (tamiflu) será efectivo.

4. Poseer aislados el virus H1N1 pandémico se pueden realizar estudios de seroprevalencia para este agente en poblaciones de cerdos, ya que este tipo de estudio a causa de la poca reactividad cruzada de los anticuerpos necesita cepas homólogas a las que circulan en las poblaciones porcinas.