

PRESENCIA DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN AVES SILVESTRES DE LOS HUMEDALES DE PUERTO VIEJO, LIMA

PRESENCE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS IN WILD BIRDS IN THE WETLANDS OF PUERTO VIEJO, LIMA

Karen Segovia H.¹, Eliana Icochea D.^{1,4}, Rosa González V.¹, Bruno Gherzi³
Armando González Z.²

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la presencia del virus de influenza aviar (IA) en aves silvestres presentes en los Humedales de Puerto Viejo, en el departamento de Lima. Novecientas muestras de heces frescas de 18 especies de aves silvestres fueron colectadas desde abril de 2008 hasta febrero de 2009. Dichas muestras se analizaron mediante aislamiento viral en huevos embrionados de pollo SPF. Se logró aislar siete cepas de virus de IA de baja patogenicidad del subtipo H12N5 (seis cepas procedentes de la especie migratoria *Arenaria interpres* y una de la especie residente *Fulica ardesiaca*). La técnica de evaluación de riesgo mediante la simulación de Monte Carlo (programa @risk) indicó que la probabilidad de encontrar el virus de Influenza A en las aves silvestres de los Humedales de Puerto Viejo es de 0.88% con un intervalo de confianza de 0.15 a 2.53%. Los resultados demuestran que las aves silvestres de los Humedales de Puerto Viejo constituyen un reservorio para los virus de influenza aviar en el Perú.

Palabras clave: virus de influenza aviar, aves silvestres, Humedales de Puerto Viejo, aislamiento viral

ABSTRACT

The objective of the study was to detect the presence of avian influenza (AI) virus in wild aquatic birds found in Puerto Viejo wetlands, Lima-Peru. Fresh faecal samples (n=900) from 18 species of wild birds were collected from April 2008 to February 2009. Samples were analyzed by virus isolation in SPF embryonated chicken eggs. Seven strains of low pathogenicity AI viruses subtype H12N5 were isolated; six from the migratory species *Arenaria interpres*, and one from the resident species *Fulica ardesiaca*. The technique

¹ Laboratorio de Patología Aviar, ² Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

³ Destacamento Naval de Investigación Médica (NMRCD), Lima

⁴ E-mail: eliana.icochea@gmail.com

of risk assessment using Monte Carlo Simulation (program @ risk) indicated that the probability of finding the AI virus in wild birds from Puerto Viejo wetlands was 0.88% with a confidence interval of 0.15 to 2.53%. The results of the study showed that wild birds from Puerto Viejo wetlands constitute a reservoir for avian influenza virus in Peru.

Key words: Avian influenza virus, wild birds, Puerto Viejo wetlands, viral isolation

INTRODUCCIÓN

La Influenza Aviar (IA) es una enfermedad de gran importancia para la industria avícola, debido a las pérdidas económicas y restricciones al comercio internacional que ocasiona, además del riesgo zoonótico potencial que representa. La enfermedad forma parte de la lista de enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2008). El virus de IA ha sido aislado en una amplia variedad de especies de aves alrededor del mundo, habiéndose descrito hasta 16 subtipos de hemaglutininas (HA) y 9 neuraminidasas (NA). En las aves silvestres, la infección es generalmente asintomática (Fouchier y Munster, 2009), y a diferencia de otros subtipos, los virus pertenecientes a los subtipos antigénicos H5 y H7 pueden volverse altamente patógenos cuando son transmitidos de las aves silvestres a las domésticas (Senne *et al.*, 1986).

La situación actual del virus de IA de alta patogenicidad, especialmente del subtipo H5N1 linaje asiático, ha cambiado la ecología y epidemiología de la enfermedad, requiriendo la generación inmediata de nuevos conocimientos en temas relacionados a su epidemiología y dinámica de transmisión. Se ha demostrado la posibilidad de introducción del virus en diversas zonas geográficas mediante el comercio internacional, ingreso ilegal y, principalmente, por la migración de aves silvestres, situación que implica un grave riesgo para los países del continente americano. El objetivo del presente estudio fue hacer seguimiento de la presencia del virus de IA en las poblaciones de aves silvestres de un área cercana a la ciudad de Lima, Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron 900 muestras de heces de aves silvestres en los Humedales de Puerto Viejo, ubicado en el distrito de San Antonio de Mala, provincia de Cañete, departamento de Lima (12°34'S y 76°42'W) (Paredes *et al.*, 2007). Las muestras se colectaron en tres periodos: abril-mayo, agosto-setiembre de 2008 y enero-febrero de 2009. Las muestras fueron colectadas en las primeras horas de la mañana, identificándose las especies a distancia con la ayuda de binoculares. Con hisopos estériles se recogió directamente del suelo de 0.3 a 0.5 g por muestra. Las heces fueron conservadas individualmente en medio de cultivo celular RPMI enriquecido al 1% con albúmina de suero bovino y transportadas a 4 °C al laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, para su procesamiento dentro de las 24 horas posteriores a su colección.

El aislamiento viral de las muestras de heces se hizo mediante la inoculación de embriones de pollo SPF de 10 días de edad, vía cavidad alantoidea, según métodos previamente descritos (Swayne *et al.*, 1998). Los huevos fueron incubados durante 120 horas, registrándose diariamente la mortalidad. Se determinó la actividad hemaglutinante del fluido alantoideo en los embriones inoculados frente a una solución de eritrocitos de pollo al 0.75%. Se confirmó la presencia de virus de IA en los fluidos con actividad hemoaglutinante, mediante el uso de un kit comercial de ELISA de captura de antígeno (QuickVue® Influenza A+B). Esta es una prueba de

inmunoanálisis de flujo lateral, que utiliza anticuerpos monoclonales de alta especificidad para los antígenos de la influenza A y B.

Simultáneamente se descartó Paramyxovirus aviar tipo 1 (APMV-1) mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, con sueros conteniendo anticuerpos específicos para el virus. Las muestras positivas a virus de IA fueron remitidas al Destacamento del Centro Naval de Investigación Médica (NMRCID), Lima, para su confirmación mediante la prueba de rRT-PCR (PCR transcriptasa reversa en tiempo real) y su subtipificación mediante secuenciación. Se usó el kit QIAamp Viral RNA (Qiagen, Valencia, California, EEUU) para extraer ARN a partir de 140 µl del fluido alantoideo positivo a hemoaglutinación. La amplificación de los genes de HA y NA fueron realizados mediante RT-PCR múltiple usando el sistema SuperScript III One-Step RT-PCR (Invitrogen, San Diego, California, EEUU). Cinco microlitros de ARN extraído fueron añadidos al master mix compuesto por una mezcla de enzimas (SuperScript III RT/Platinum Taq; Invitrogen), 3.2 mM MgSO₄ y 0.4 mM de dNTP.

Los cebadores usados para la detección del gen de HA fueron H12-11F (AGCAAAGCAGGGGAAAATA) y H12-431R (GGTGAAATCAAACATCTTCA) y los usados para los genes de NA fueron NA-1 (AGC AAAAGCAGGAGTGAAAA) y NA-1413R (AGTAGAAACA-AGGAGT-TTTTT). Los análisis fueron llevados a cabo en un secuenciador ABI 3130 DNA (Applied Biosystems). Los datos de secuencia fueron armados y editados con el software Sequencer 4.8. Las secuencias fueron comparadas contra secuencias publicadas usando programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local (BLAST; NCBI, 2011).

Los datos obtenidos fueron sometidos a la técnica de evaluación de riesgo mediante la simulación Monte Carlo. Las proporciones se expresaron con un intervalo de con-

fianza al 95%. Se utilizó el paquete estadístico @Risk en el entorno de una planilla electrónica Excel XP.

RESULTADOS

Se aislaron siete cepas de virus de IA de baja patogenicidad del subtipo H12N5 en 900 muestras de heces frescas colectadas en 18 especies de aves silvestres, presentes en los humedales de la zona de Puerto Viejo. De estas cepas, seis fueron aisladas en la especie migratoria *Arenaria interpres* y una en la especie residente *Fulica ardesiaca*. Además, se aislaron tres cepas de APMV-1 en la especie residente *Anas bahamensis* (Cuadro 1). Las muestras positivas a IA fueron colectadas entre abril y mayo de 2008, y las muestras positivas a APMV-1 fueron colectadas entre enero y febrero de 2009.

La técnica de evaluación de riesgo mediante la simulación de Monte Carlo (programa @Risk) indicó que la probabilidad de encontrar el virus de IA en las aves silvestres de los Humedales de Puerto Viejo es del 0.88%, con un intervalo de confianza de 0.15 a 2.53%. Asimismo, no hubo diferencias estadísticas significativas entre las prevalencias encontradas para cada periodo de muestreo.

DISCUSIÓN

Las muestras positivas correspondieron en su mayoría a *Arenaria interpres*, una de las especies de aves reportadas como de mayor susceptibilidad a los virus de IA (*Charadriiformes*), reafirmando los hallazgos establecidos en estudios previos de la enfermedad en otras partes del mundo (Stallknecht *et al.*, 1990). Resultados similares han sido observados en Argentina en muestras de hisopados cloacales de aves silvestres donde se detectaron 12 (12/2495) muestras positivas al virus de IA mediante la técnica de rRT-PCR, reportándose, además, el aislamiento de un virus del subtipo H13N9

Cuadro 1. Aislamiento del virus de Influenza Aviar (IA) y Paramyxovirus aviar tipo 1 (APMV-1) en muestras de heces de aves silvestres de los Humedales de Puerto Viejo, entre abril de 2008 a febrero de 2009

Especie	N.º de muestras	HA ¹	APMV-1	IA	Subtipo
<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	90	0	-	-	-
<i>Fulica ardesiaca</i>	80	1	-	+	H12N5
<i>Calidris alba</i>	20	0	-	-	-
<i>Larus modestus</i>	100	0	-	-	-
<i>Larus cirrocephalus</i>	10	0	-	-	-
<i>Anas bahamensis</i>	180	3	+	-	-
<i>Numenius phaeopus</i>	130	0	-	-	-
<i>Anas cyanoptera cyanoptera</i>	60	0	-	-	-
<i>Ardea alba</i>	10	0	-	-	-
<i>Egreta thula</i>	10	0	-	-	-
<i>Arenaria interpres</i>	20	6	-	+	H12N5
<i>Himantopus mexicanus</i>	30	0	-	-	-
<i>Larosterna inca</i>	30	0	-	-	-
<i>Sula variegata</i>	10	0	-	-	-
<i>Gallinula chorlopus</i>	80	0	-	-	-
<i>Haematopus palliatus</i>	10	0	-	-	-
<i>Larus pipixcan</i>	20	0	-	-	-
<i>Ncticora ncticorax</i>	10	0	-	-	-
Total	900	10	3	7	

¹ Hemoaglutinación

de una gaviota (*Larus dominicanus*) (Pereda *et al.*, 2008). Asimismo, de 93 muestras de hisopados cloacales de 11 especies de aves silvestres colectadas en Bolivia en el 2001 se logró aislar una cepa de virus del subtipo H7N3 de una cerceta colorada (*Anas cyanoptera*) (Spackman *et al.*, 2007). El análisis de este subtipo demostró que cinco de los ocho genes del virus estaban relacionados con el virus H7N3 aislado en Chile en el 2002; sin embargo, estos datos no estuvieron disponibles cuando ocurrió el brote.

En el Perú, en un estudio realizado entre junio de 2006 a diciembre de 2007, se aislaron nueve subtipos de virus de IABP por aislamiento viral a partir de muestras fecales de aves silvestres colectadas en zonas de costa (Gherzi *et al.*, 2009). En otro estudio similar en el 2008, se aisló, a partir de muestras de heces frescas de patos colorados (*Anas cyanoptera*) de los Pantanos de Villa, un virus de IA de baja patogenicidad del subtipo H7N3 (Gherzi *et al.*, 2011). Los diversos reportes permiten aseverar que los

virus de IA del subtipo H7 de baja patogenicidad se encuentran circulando en las aves silvestres en Sudamérica.

En el presente estudio, las muestras positivas se obtuvieron en los meses de verano, coincidiendo con el periodo donde se produce una alta concentración de aves silvestres migratorias en la zona; sin embargo, dada la baja prevalencia de muestras positivas, no se observó diferencias significativas asociadas a la época de muestreo (Canevari *et al.*, 2001). Los datos obtenidos se pueden relacionar con los hallazgos realizados por Hinshaw *et al.* (1982), quienes señalan que la prevalencia del virus es baja durante el invierno boreal y en áreas de invernada de las aves (Webster *et al.*, 1992). La inmunidad de la bandada se desarrolla después de la migración, lo cual repercute en la tasa de replicación y posterior eliminación de viriones infectivos, disminuyendo el porcentaje de aislamiento del virus en el laboratorio (Zarkov, 2008).

A pesar que la frecuencia de infección de los virus IA en aves silvestres en Sudamérica no está bien determinada, la detección y caracterización molecular de las cepas detectadas en los Humedales de Puerto Viejo, reafirman la posibilidad de estas aves de diseminar el virus de IA en otras partes del mundo y de aumentar la posibilidad de que sean perpetuados durante todo el año por las aves silvestres, especialmente las aves pertenecientes al orden *Charadriiformes* (Spackman *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

Se aislaron siete cepas de virus de IA de baja patogenicidad del subtipo H12N5 de aves silvestres, con una prevalencia de infección de 0.88%, lo cual demuestra que las aves silvestres, migratorias y residentes de los Humedales de Puerto Viejo, Lima, estuvieron expuestas a los virus de IA y constituyen un reservorio del virus en el país.

LITERATURA CITADA

1. **Canevari P, Castro G, Sallaberry M, Naranjo LG. 2001.** Guía de los chorlos y playeros de la región Neotropical. Santiago de Cali, Colombia: Asociación Calidris. 141 p.
2. **Fouchier RA, Munster VJ. 2009.** Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. *Rev Sci Tech* 28(1): 49-58.
3. **Gherssi BM, Blazes D, Icochea E, González R, Kochel T, Tinoco Y, Sovero M, et al. 2009.** Avian influenza in wild birds, central coast of Peru. *Emerg Infect Dis* 15: 935-938.
4. **Gherssi BM, Sovero M, Icochea E, González R, Blazes D, González A, Montgomery J. 2011.** Isolation of low-pathogenic H7N3 Avian Influenza from wild bird in Peru. *J Wild Dis* 47: 792-795.
5. **Hinshaw VS, Webster RG, Rodríguez RJ. 1981.** Influenza A viruses: combinations of hemagglutinin and neuraminidase subtypes isolated from animals and other sources. *Arch Virol* 67: 191-201.
6. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008.** Avian Influenza. En: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6th ed. París: OIE. p 465-481.
7. **Paredes C, Iannacone J, Alvarino L. 2007.** Biodiversidad de invertebrados de los humedales de Puerto Viejo, Lima, Perú. *Neotropical Helminthol* 1(1): 21-30.
8. **Pereda AJ, Uhart M, Perez A, Zaccagnini M, La Sala L, Decarre J, Gojman A, et al. 2008.** Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: Evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America. *Virology* 378: 363-370.
9. **Senne DA, Pearson JE, Kawaojka Y, Carbrey EA, Webster RG. 1986.** Alternative methods for evaluation of pathogenicity of chicken Pennsylvania H5N2 viruses. In: Easterday BC (ed). *Proc Second International Symposium on*

- Avian Influenza. US Animal Health Association: Richmond, VA. p 246-257.
- 10. Spackman E, McCracken KG, Winker K, Swayne DE. 2007.** An avian influenza virus from waterfowl in South America contains genes from North American avian and equine lineages. *Avian Dis* 51(Suppl 1): 273-274.
 - 11. Swayne DE, Senne DA, Beard CW. 1998.** Avian influenza. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW (eds). *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. 4th ed. Pennsylvania, USA: International Book Distributing. p 150-155.
 - 12. Stallknecht DE, Shane SM, Kearney MT, Zwank PJ. 1990.** Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis* 34: 406-411.
 - 13. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. 1992.** Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-179.
 - 14. Zarkov I. 2008.** Ecological features of influenza A virus infection in wild birds. *Bulg J Vet Med* 11(1): 13-20.