

ESTUDIO SOBRE INFLUENZA EN AVES ANTARTICAS *

JOSE MARIA ARECHABALA ** Y RICARDO NOVATTI ***

ABSTRACT: Study about Influenza in antarctic birds.

The important question about Influenza epidemiology even not answered, and the possible relationship between birds and human influenza stimulated our interest to research HAI antibodies, to internal antigens (RNP) antibodies, and isolation attempts in embrionated hens eggs, from birds of isla Media Luna, Argentine Antarctic.

Fifteen antigens were used, 282 serums and 96 tracheal and cloacal swabs from different avian species were collected, these materials were sampled during the period December 12, 1978 up to January 30, 1979.

HAI antibodies against the antigens studied were not detected.

Antibodies to internal antigens types A and B Influenza virus were not detected.

Isolation was not obtained.

The results obtained shows that, had not indirect nor straight evidence on birds in the area and the period studied of Influenza infection.

INTRODUCCION

Las cepas de influenza aviarias actualmente conocidas corresponden al tipo A, habiendo varios subtipos (Lang, 1972), éstos están estrechamente relacionados antigénicamente entre sí, aun cuando han sido aislados de diferentes especies, en épocas diferentes y en áreas geográficas distintas (Pereira, 1965).

Por otra parte, se ha demostrado la existencia de virus de influenza aviaria con antígenos de superficie, similares a los virus de influenza A que infectan al hombre (Pereira, 1967), así, se han descripto agentes de influenza conteniendo neuraminidasa biológica e inmunológicamente similar a las cepas humanas A/WS/33 (H₁N₁), (Schild, 1969), A/Singapore/1/57 (H₂N₂) y a la variante A/Hong Kong/8/68 (H₃N₂), (Dasen, 1970 y Higgins, 1972).

Otros trabajos indican que algunas cepas aviarias tienen antígeno de superficie relacionados con los agentes de la influenza aislados en porcinos y equinos (Tumová y Easterday, 1968; Tumová y Pereira, 1968; Tumova y Schild, 1972).

Existen además, un gran número de combinaciones de los antígenos hemoaglutinina y neuraminidasa de las cepas aviarias circulando simultáneamente en una misma o distinta población de aves (Shortridge, 1977).

Los estudios relacionados con la detección de anticuerpos en los sueros aviarios demuestran en forma indirecta la infección de estas aves con la cepa humana A/Hong Kong

* Trabajo presentado en el 1er. Encuentro Iberoamericano de Ornitología y Mundial sobre Ecología y Comportamiento de las Aves (1er. Congreso Iberoamericano de Ornitología). Buenos Aires, 25-XI al 1-XII de 1979.

** División Diagnóstico de Virus, Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán", Av. Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina.

*** Instituto Antártico Argentino, Cerrito 1248, Buenos Aires, Argentina.

/8/68 (H3 N2), contra las cepas equinas A/Equina Praga/1/56 (Heq 1 Neq 1) y A/Equina Miami/1/63 (Heq2Neq2), (Zankstelskaja, 1972 y Expand Programme on the Ecology of Influenza virus, 1978) y contra la cepa porcina A/Swine Towa/15/30 (Hswl N1) (Slepuskin, 1972). Se han detectado, asimismo, anticuerpos en gansos contra cepas de influenza aviaria aisladas en pavos (Winkler, 1972)

Estas observaciones sugieren que las aves, sobre todo las migratorias, pueden estar comprendidas en la diseminación de estos agentes virales en vastos territorios, y además, podrían jugar algún papel nada despreciable, en la epidemiología de la influenza humana.

En muchas áreas del mundo la epidemiología de la influenza no está registrada, o por lo menos, no documentada, por lo tanto, el objeto de este trabajo era establecer si las aves antárticas tenían anticuerpos contra algunos agentes de influenza aviarios, humanos, porcinos o equinos como una evidencia indirecta de infección, y tratar de lograr algún aislamiento de virus de influenza para comprender mejor su historia natural, todavía no aclarada.

Para ello se realizó el estudio serológico por inhibición de la hemoaglutinación (IHA) y por inmunodifusión (ID), e intento de aislamiento sobre hisopados de tráquea y cloaca en nueve especies pertenecientes a seis familias, empleando 15 antígenos en total: 3 antígenos humanos tipo A; 1 antígeno humano tipo B; 1 antígeno porcino; 2 antígenos equinos y 8 antígenos aviarios.

MATERIALES Y METODOS

AREA DE ESTUDIO, SUEROS Y MATERIALES PARA AISLAMIENTO

Los sueros y material para aislamiento correspondieron a aves, la mayoría de las cuales anidan en la isla Media Luna, denominada así por su forma; es de superficie reducida y naturaleza rocosa. Se encuentra a los 62° 36' de latitud Sur y 59° 54' de longitud Oeste, a la entrada de la bahía Luna de la isla Livingston (islas Shetland del Sur). Su perímetro es de unos 3 km y presenta tres colinas o cerros bajos característicos (90 a 100 metros de altura), donde anidan algunas aves aquí tratadas. La altura de la pequeña isla sobre el nivel del mar es de 22 m, y los siguientes son valores de elementos meteorológicos que estimamos pueden interesar (Schwerdtfeger):

1. Temperatura del aire (valores promedio)	° C
Verano (diciembre-enero-febrero)	1.4
Máxima media	2.9
Mínima media	0.7
Anual	2.9
2. Humedad relativa (valores promedios)	%
Verano	91
Anual	86
3. Precipitación media (equivalente en agua)	mm
Verano (suma de media mensual)	144
Anual (suma anual media)	869

El manto de nieve que cubre la isla durante el invierno desaparece por fusión, en un 30 % aproximadamente, durante el verano.

Las tareas realizadas formaban parte del programa de investigación científica del Instituto Antártico Argentino, durante la campaña antártica de verano 1978-79.

Fueron recolectados 282 sueros de distintas especies sangradas por punción cardíaca y 96 hisopados de tráquea y cloaca en total, entre el 12 de diciembre de 1978 y 30 de enero de 1979.

Las especies aviarias que nidifican en la isla Media Luna, de las que se obtuvieron los sueros e hisopados traqueales y cloacales, son las siguientes:

Familia	Especie	Sueros	HT-HCL ¹
Spheniscidae	<i>Pygoscelis antarctica</i>	153	15
Hydrobatidae	<i>Oceanites oceanicus oceanicus</i>	1	6
Phalacrocoracidae	<i>Phalacrocorax atriceps bransfieldensis</i>	23	6
Chionidae	<i>Chionis alba</i>	9	10
Stercorariidae	<i>Catharacta skua lönnerbergi</i>	14	21
Laridae	<i>Larus dominicanus</i>	3	6
	<i>Sterna vittata gaini</i>	3	2
Spheniscidae ²	<i>Pygoscelis papua ellsworthi</i>	74	15
	<i>Pygoscelis adeliae</i>	2	15
Total		282	96

En total, 9 especies pertenecientes a seis familias.

Todos los sueros fueron enterrados en la nieve, por carecer de congeladora, a dos metros de profundidad, con el agregado de azida de sodio al 1:10.000 para evitar la contaminación bacteriana y posteriormente embarcados en la refrigeradora del Bahía Aguirre, para ser conservados a -20° C en el Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán" hasta su procesamiento definitivo.

TRATAMIENTO DE LOS SUEROS E HISOPADOS

Los sueros fueron diluidos 1:20 en PBS pH 7,2, inactivados a 56° C durante 30 minutos y adsorbidos con glóbulos rojos de gallo, lavados en solución fisiológica y en suspensión al 50 %, cada ml de suero 1:20 inactivado fue adsorbido con 0.2 ml de esta suspensión y luego procesados por la prueba de IHA.

Para la prueba de ID se utilizó suero sin diluir y no inactivados.

Los hisopos fueron sumergidos en 2 ml de un medio de transporte constituido por una mezcla de PBS pH 7.2 y glicerina al 50 %, con penicilina 10.000 U/ml, estreptomicina 10 mg/ml y gentamina 8 mg/ml y conservados en tanque de nitrógeno líquido.

Se inocularon 2 embriones de gallina Leghorn de 9-11 días de edad por cada muestra, cada embrión recibió 0.3 ml por vía alantoidea.

Incubación a 37° C durante 48 horas y posterior cosecha de los líquidos alantoideos, previamente enfriados a 4° C durante 5 horas, para evitar la hemorragia al ser cosechados, y se detectaba su actividad hemoaglutinante frente a una suspensión de glóbulos rojos de gallo, cobayo y humano "O" al 0,5 %, en PBS pH 7.2

Se realizaron dos pasajes por cada muestra.

ANTIGENOS PARA LA PRUEBA DE IHA

Antígenos humanos tipo A

A/Hong Kong/8/68	H3 N2	Local
A/Buenos Aires/2/78 ³	H3 N2	Local
A/URSS/90/77	H1 N1	C.D.C.

¹ Hisopos traqueal y cloacal sumergidos en el mismo tubo con medio

² Especies no criadoras en la isla, que fueron estudiadas aquí.

³ Similar a A/Texas/1/77 (H3 N2), aislada de un brote de influenza en C.I.P.R.A. (Centro de Instrucción Profesional de la Aeronáutica, Buenos Aires, Arechabala, 1979).

Antígeno humano tipo B

B/Hong Kong/5/72

C.D.C. C.D.C.

Antígeno porcino

A/New Jersey/1/76

Hsw1 N1

C.D.C. C.D.C.

Antígenos equinosA/Equina Buenos Aires/4/76⁴

Heq1 Neq1

C.D.C.

A/Equina Miami/1/63

Heq2 Neq2

C.D.C.

Antígenos aviarios

A/Turkey Oregón/71

Hav1 Nav2

A/Chicken Germany "N"/49

Hav2 Neg2

A/Duck England/56

Hav3 Nav1

A/Duck Checoeslovaquia/56

Hav4 Nav1

A/Tern South Africa/61

Hav5 Nav2

A/Turkey Mass./65

Hav6 N2

A/Duck Ukraina/1/68

Hav7 Naq2

A/Turkey Ontario/6118/68

Hav8 Nav4

Estos antígenos aviarios fueron proporcionados por el Dr. Alan P. Kendal, Department of Health, Education and Welfare, Atlanta, U.S.A.

ANTIGENOS PARA LA PRUEBA DE ID

Las cepas utilizadas fueron las siguientes:

A/Buenos Aires/2/78

H3 N2

B/Hong Kong/5/72

Los antígenos fueron preparados en embriones de gallina Leghorn, de 9-11 días de edad, según método de Beard (Beard, 1970).

MEDIO PARA ID

El medio consistió en indubiosa A 37 (agarosa), del Laboratorio Biológico Francés, al 2% en solución fisiológica con el agregado de azida de sodio al 1:10.000 en PBS pH 7.2

SUEROS HIPERINMUNES DE REFERENCIA COMO CONTROLES PARA ID

Se utilizaron sueros hiperinmunes FC de tipos A y B de influenza, preparados en co-bayos y proporcionados por el C.D.C., Atlanta, U.S.A.

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

Se utilizaron portaobjetos comunes a razón de 2 ml de agarosa al 2 % por cada placa.

Se hicieron 6 cavidades en la periferia de una cavidad central, la distancia fue de 4 mm de centro a centro y el diámetro de cada cavidad de 3 mm. se utilizó para ello un sacabocado de cobre conectado a una fuente de vacío.

Previamente a la preparación de las cavidades, las placas fueron enfriadas a 4° C durante 24 horas en cámara húmeda; cada placa permitió el estudio de 11 sueros, con dos hexágonos por placa, dejando un control de antígeno-suero de referencia por cada placa utilizada.

⁴ Similar a la capa equina A/Praga/1/56, aislada en el Instituto Malbrán a partir de una epizootia en equinos en la ciudad de Buenos Aires (Arechabala, 1977 y 1978).

Se agregaron los reactivos, con capilares de precisión de 10 cm de longitud, Hyland, de Laboratorio Travenol, California, U.S.A.

Una vez sembradas las placas, se dejaron en cámara húmeda a temperatura ambiente, haciendo las lecturas a las 24 y 48 horas.

PRUEBA DE IHA

Se utilizaron glóbulos rojos de gallo, cobayo y humano "O", recolectados en Alsever, lavados 3 veces en solución salina y en suspensión al 0,5%, en PBS pH 7.2

Se empleó el sistema de microtitulación en placas, los antígenos a razón de 4 unidades hemoaglutinantes; las lecturas se realizaron a los 60' de incubación a temperatura ambiente.

RESULTADOS

No se detectaron anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra los antígenos estudiados.

No se detectaron anticuerpos contra el antígeno interno (RNP) de los tipos A y B de influenza.

No se logró aislamiento.

DISCUSION

La ley biológica general señala que todas las especies estudiadas aquí abandonan sus lugares de cría para retornar en la siguiente estación favorable.

Las condiciones ecológicas para la nidificación de estas diferentes especies permiten este fenómeno migratorio a la mayoría de las aves que lo realizan a esas latitudes.

Las ausencias se deben a la carencia de lugar, si recordamos lo reducida que es la isla.

Estas aves retornan a los mismos lugares y aun a los mismos nidos, si estos están protegidos, o al mismo emplazamiento del nido anterior si son a cielo abierto; existen excepciones, pues hay ejemplares no muy numerosos, que permanecen en la región alimentándose naturalmente en las "lagunas" abiertas en el hielo marino o por ejemplo *Chionis alba* puede vivir de restos y residuos de los establecimientos humanos.

Las aves migratorias estudiadas aquí tienen casi todas ellas un amplio radio de alcance, a saber:

Pygoscelis antarctica: hasta el norte de las islas Malvinas.

Oceanites oceanicus oceanicus: hasta las costas del Labrador y Escandinavia.

Chionis alba: costas patagónicas, de la provincia de Buenos Aires (Mar del Plata) y el Uruguay.

Phalacrocorax atriceps bransfieldensis: se ignora, con probabilidad hasta bajas latitudes del océano austral.

Catharacta skua lönnbergi: es circunpolar, se ignora hasta donde migra con certeza, pero se ha registrado al norte del Ecuador. Es de gran poder de vuelo, facilitando su desplazamiento sobre grandes extensiones.

Larus dominicanus: es circunpolar, y podría suponerse que llega hasta las proximidades del Ecuador.

Sterna vittata: hasta la costa argentina y algunos suponen que también hasta la chilena.

Pygoscelis papua: hasta los 43° de latitud sur.

Pygoscelis adeliae: permanece dentro de la región antártica, en latitudes con aguas libres.

Los resultados obtenidos, aun siendo negativos, no invalidan la hipótesis sustentada por muchos investigadores, que las aves deben jugar un papel en la epidemiología de la influenza humana, a la luz de los innumerables trabajos publicados, al respecto, se han de-

TECTADO anticuerpos contra la neuraminidasa de las cepas A/Japón/305/57 (H2 N2) y A/Hong Kong/68 (H3 N2), ambas humanas, en el año 1969 en *Puffinus chlororhynchus* (Dasen y Laver, 1970), ave no migratoria de las islas Tryon y Heron, en el norte de Australia.

De la misma manera, se demostraron anticuerpos contra la hemoaglutinina de las cepas A/Hong Kong/68 (H3 N2) humana y contra la A/Equina Miami/1/63 (Heq2 Neq2), en 1969, en aves silvestres migratorias de la región central de Rusia (Zankstelskaja, 1972), a saber:

Herring gulls (*Larus argentatus*) o Gaviota Arenquera, especie ampliamente distribuida en el hemisferio norte, tal vez la gaviota más común sobre las costas atlánticas de América del Norte y Europa.

Arctic loons, llamadas vulgarmente Gavias o Somormujos, de éstas existen 4 especies todas migratorias; una de éstas, la *Gavia arctica*, nidifica también en la región occidental de la bahía de Hudson, en la parte septentrional de América del Norte; inverna en el sur a lo largo de las costas del Pacífico hasta California, China y Japón; en Europa llega hasta el Mediterráneo y mar Negro, pero sólo accidentalmente se la encuentra sobre la costa Atlántica de América del Norte.

Clangula hyemalis o Vieja Squaw, es circumpolar en las regiones árticas y subárticas.

En el año 1970 (Zankstelskaja, 1972) fueron detectados anticuerpos IHA contra la cepa porcina A/Swine Iowa/15/30 (Hsw1 N1) en *Anas formosa* o Pato Baikal de la Siberia Oriental.

En *Gallinago gallinago*, Becasina; en *Anas falcata*, pato fácilmente domesticable y *Larus crassirostris* de la misma área geográfica, todas estas aves migran al sudeste de Asia y China, regiones donde la influenza pandémica parece originarse.

Finalmente, en *Puffinus tenuirostris* o Petrel de Pico Liviano, que habita el Pacífico norte y sur, nidifica en el estrecho, entre Australia y Tasmania, y realiza migraciones anuales en el sentido de las agujas del reloj, recorriendo por completo la hoya pacífica para volver a sus lugares de cría; es, tal vez, responsable del eslabon de influenza aviaria en áreas del Hemisferio Norte y costas australianas (Dasen y Laver, 1970).

Estas investigaciones son dignas de tener en consideración porque sientan un precedente que no debe ser desechado para intentar comprender mejor la historia natural de la influenza.

Nuestro lugar de trabajo fue la isla Media Luna, pequeña área geográfica que forma parte de un extenso habitat, las islas Shetland del Sur, cuyas condiciones ecológicas para la vida animal pueden considerarse sin variaciones significativas, y donde sólo nueve especies de aves han sido investigadas, de las cuales seis crían en la zona.

En el archipiélago de las Shetland del Sur nidifican nueve especies diferentes de las ya estudiadas y aptas para continuar con las investigaciones sobre el tema; ello podría realizarse en sucesivas campañas para la composición en mosaico de nuestro propósito.

Los hábitos migratorios de estas especies presentan variantes dignas de ser consideradas, puesto que el alcance de sus desplazamientos las ponen en contacto con regiones pobladas por seres humanos y sus instalaciones.

Sin abrir un juicio definitivo, y teniendo en cuenta los estudios realizados, la isla Media Luna pareciera diferir de otras áreas geográficas estudiadas con resultados distintos a los nuestros, no obstante ello, entendemos prudente y de interés continuar con las investigaciones en la misma área o en otra zona antártica, tratando de lograr mayor número de muestras. Este estudio más amplio permitirá concretar juicios y conocer mejor si las aves antárticas, como algunas aves de otros continentes, tienen o no relación con los estudios considerados.

AGRADECIMIENTOS

Al Director del Instituto Antártico Argentino, capitán de navío (RE), Roberto M. Martínez Abal. A las Fuerzas Armadas Argentinas, que hicieron posible el programa de investigación. Al mayor Luis Tramontana por la constante colaboración prestada. Al Dr. Jorge Bernaldez, por la eficiente coordinación en el proyecto. Al Laboratorio Squibb S.A. I.C., por haber proporcionado penicilina y estreptomycinina para el tratamiento de los materiales. Al Laboratorio Essex Argentina S.A.I.C., por haber proporcionado gentamicina para el tratamiento de los materiales.

BIBLIOGRAFIA

- ARECHABALA, J.M., 1977. Influenza en la República Argentina desde 1968 a 1976. Influenza humana y animal. VII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Resúmenes de relatos y comunicaciones libres, 258, Buenos Aires.
- , N.A. CANDURRA, I.A. LANGER y M.I. SERRIA, 1978. Caracterización de cepas de influenza equina subtipo 1, aisladas en Buenos Aires durante la epizootia de 1976. *Revista Militar Veterinaria*, XXV (117):302-311, Buenos Aires.
- , R. IACONO, 1979. Influenza humana 1978. Presencia de 2 subtipos diferentes de influenza A en Buenos Aires. *Jornada Médica*, 9(435):8-14, Buenos Aires.
- AUSTIN, O.L., 1961. Birds of the world. Golden Press, New York.
- BEARD, C.W., 1970. Demonstration of type specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion. *Bull WHO*, 42:779-785.
- BERLIOZ, J., 1950. Systematique. Traité de zoologie, publié sous la direction de Pierre P. Grassé, T. XV, Oiseaux. Mason et Cie. Paris.
- DASEN, C.A. y W.G. LAVER, 1970. Antibodies to Influenza viruses in sera from Australian Shearwaters. *Bull WHO*, 42:885-889.
- EXPAND PROGRAMME ON THE ECOLOGY OF INFLUENZA VIRUS, 1978, International Workshop, Bethesda, 13-14.
- HIGGINS, D.A. y G.C. SCHILD, 1972. Characterization of the haemoagglutinin and neuraminidase antigens of same recent avian type A Influenza virus isolates from Hong Kong. *Bull. WHO*, 47:531-534.
- LANG, G., B. TUMOVA y G.C. SCHILD, 1972, A new subtype of type A Influenza virus isolated from turkeys. *Bull. WHO*, 47:515-519.
- MURPHY, R.C., 1936. Oceanic birds of South America, Vol. I y II. The Macmillan Co., The American Museum of Natural History, New York.
- PEREIRA, H.C., B. TUMOVA y V.G. LAW, 1965. Avian Influenza A virus. *Bull WHO*, 32:8. j.
- , B. TUMOVA y R.G. WEBSTER, 1967. Antigenic relationship between Influenza A viruses of human and avian origins. *Nature*, 215:982.
- SCHILD, G.C. y H.G. PEREIRA, 1969. Characterization of the ribonucleoprotein and neuraminidase on Influenza A viruses by immunodiffusion. *J. Gen. Virol.*, 4:355-363.
- SCHWERDTFEGER, W., L.M. DE LA CANAL y J. SCHOLTEN. Meteorología descriptiva del sector antártico sudamericano. Publicación N° 7 del Instituto Antártico Argentino, Buenos Aires.
- SHORTTRIDGE, K.F., W.K. BUTTERFIELD, K.G. WEBSTER y C.H. CAMPBELL, 1977. Isolation and characterization of Influenza A virus from avian species in Hong Kong. *Bull. WHO*, 55:15-19.
- SLEPUSKIN, A.N., V. PYSINAT, F.K. GONZOVSKY y otros, 1972. Haemoagglutination inhibiting activity to type Influenza virus in the sera of wild birds from the far east of the URSS, *Bull WHO*, 47:527-530.
- TUMOVA, B. y B.C. EASTERDAY, 1968. Relationship of envelope antigens of Influenza viruses to human A2 Influenza strains isolated in the years 1957-58. *Bull. WHO*, 41:429-435.
- y H.G. PEREIRA. Antigenic relationship between Influenza A virus of human and animal. *Bull. WHO*, 38:415-420.
- y G.C. SCHILD, 1972. Antigenic relationship between type A influenza viruses of human, porcine, equine and avian origin. *Bull. WHO*, 47:453-460.

WINKLER, W.G., D.O. TRaine y B.C. EASTERDAY, 1972. Influenza in Canada Geese *Bull. WHO*, 47:507-513.

ZANKSTELSKAJA, L.J., V.A. ISACENKO, N.G. OSIDZE y otros, 1972. Some observations on the circulation of Influenza virus in domestic and wilds birds. *Bull. WHO.*, 47:497-501.