

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA EQUINA SUBTIPO H3N8 DEL SUBLINAJE FLORIDA CLADE 1 EN MUESTRAS DE CABALLOS EN ESPAÑA



Azucena Sanchez¹, M^a Dolores Buitrago², M^a José Ruano¹, Elena San Miguel¹, José Antonio Bouzada¹, Manuel Durán¹ y Montserrat Agüero¹
 (1) Laboratorio Central de Veterinaria, Algete. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y (2) Tecnologías y Servicios Agrarios SA.

INTRODUCCION:

La gripe o influenza equina (VIE) es una infección respiratoria aguda de caballos, asnos, mulas y cebras, producida por un virus de la familia Ortomixoviridae, género Influenza virus A. Es un virus pleomórfico, cuyo genoma está compuesto de ocho segmentos que codifican 8 proteínas individuales. Posee una envoltura, en la cual se localizan la glicoproteínas de superficie hemoaglutinina (H) y neuraminidasa (N). (Fig. 1). Se han descrito dos subtipos bien diferenciados del virus, el subtipo H7N7, antes llamado equi-1, y el subtipo H3N8, antes llamado equi-2, aunque no se han detectado virus del subtipo H7N7 desde finales de los años 70.

El subtipo H3N8 presenta dos linajes: el euroasiático y el americano, que comprende a su vez tres sublinajes: Florida, Kentucky y Sudamérica. El linaje euroasiático se aisló por última vez en Suiza en 2007. El sublinaje Florida, diversificado en dos clades, es desde hace una década el de mayor relevancia epidemiológica a nivel mundial, siendo el clade 1 el predominante en USA y el 2 el más frecuente en Europa (Fig. 2).

En équidos muy susceptibles, los signos clínicos incluyen fiebre, tos seca y áspera seguida de secreción nasal mucopurulenta. En animales vacunados con inmunidad parcial, puede estar ausente

uno o más de estos signos. Los caballos infectados vacunados pueden seguir excretando el virus y servir de fuente de virus a otros animales.

A lo largo del último año, se ha registrado un aumento en la actividad de influenza equina reportada en Europa. A finales de diciembre 2018 se registraron múltiples brotes en el norte de Francia, y a partir de las primeras semanas de 2019 se aumentaron también los diagnósticos positivos en el resto del territorio de Francia, así como en Bélgica, Alemania, Irlanda, Países Bajos, Dinamarca, Suecia y Reino Unido. Estos brotes han sido causados por VIE H3N8 del sublinaje Florida clade 1.

En España, entre los meses de marzo y mayo de 2019, se han diagnosticado 27 casos de Influenza equina afectando a 6 CCAA (Andalucía, Castilla y León, Comunidad Foral de Navarra, Comunidad Valenciana, Galicia y País Vasco). Todos ellos fueron confirmados en el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete mediante la detección del genoma viral por RT-PCR en muestras de hisopos nasofaríngeos de animales sintomáticos. También se estudió la evolución del título de anticuerpos frente al VIE en muestras de sueros pareadas, tomadas a los animales sospechosos con un intervalo de 15 días, para demostrar un aumento en el título de anticuerpos específicos.

MATERIALES Y MÉTODOS:

- Material biológico: se analizaron 48 hisopos nasofaríngeos (Fig. 3) y 53 muestras de suero pareadas con más de 14 días de diferencia entre las dos extracciones (Fig. 4).
- La detección del genoma viral se realizó utilizando una RT-PCR dirigida a la región de la proteína Matriz (gM) en muestras obtenidas con hisopos orofaríngeos de animales sintomáticos (Heine et al., 2007). Este es el sistema de análisis recomendado en el manual de la OIE (2019) (capítulo 3.5.7).
- Las muestras positivas al análisis por RT-PCR se inocularon en huevos embrionados de gallina de 10-11 días por vía alantoidea (Fig. 5). A partir de los líquidos obtenidos de estos cultivos se realizó la prueba de hemoaglutinación (HA) con glóbulos rojos de gallina y un título superior a 16 se consideró positivo (Fig. 6 y 7). Cuando el título fue bajo o negativo se realizaron pases ciegos según se recomienda en el Manual de la OIE, 2019. El aislamiento viral fue confirmado posteriormente por RT-PCR, por Inhibición de la hemoaglutinación (IH) e Inhibición de la Neuraminidasa (IN) con antisueros específicos (H3N8 y H7N7). Ver tabla 1
- La prueba de inhibición de la hemoaglutinación de las muestras de suero (Fig. 8) se llevó a cabo con los antígenos: **H3N8 CLADE 2 sublinaje Florida** (Richmond/2007/equine influenza virus), **VIE H3N8 Florida CLADE 1** (Rio Grande Do Sul/2012/equine influenza virus) y **VIE H7N7** (Prague/1956/equine influenza virus) (Tabla 1).
- El estudio filogenético se llevó a cabo mediante el análisis de la secuencia completa (1689 pb) del gen de la Hemaglutinina (HA) (Gildea et al., 2012, 2013 y 2018) de los 5 aislados españoles del virus, 4 secuencias de la base de datos de GISAID (Global initiative on sharing all influenza data) y 54 secuencias de Genbank del NCBI que fueron alineadas con el Software Muscle (v3.7) y analizadas con PhyML (v3.0) (Fig. 9).

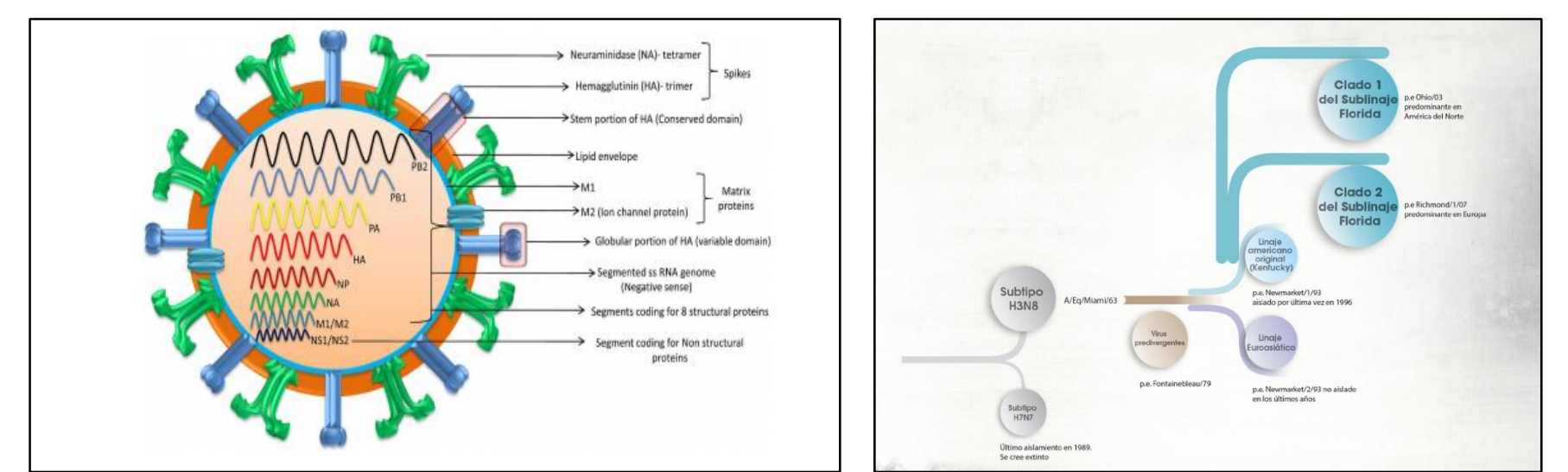


Fig. 1: Esquema del virus Influenza equina (Singh et al., 2018)

Fig. 2: Linajes del virus Influenza equina.



Fig. 3: Toma de muestra con hisopo nasal. (pasofinotv.com).

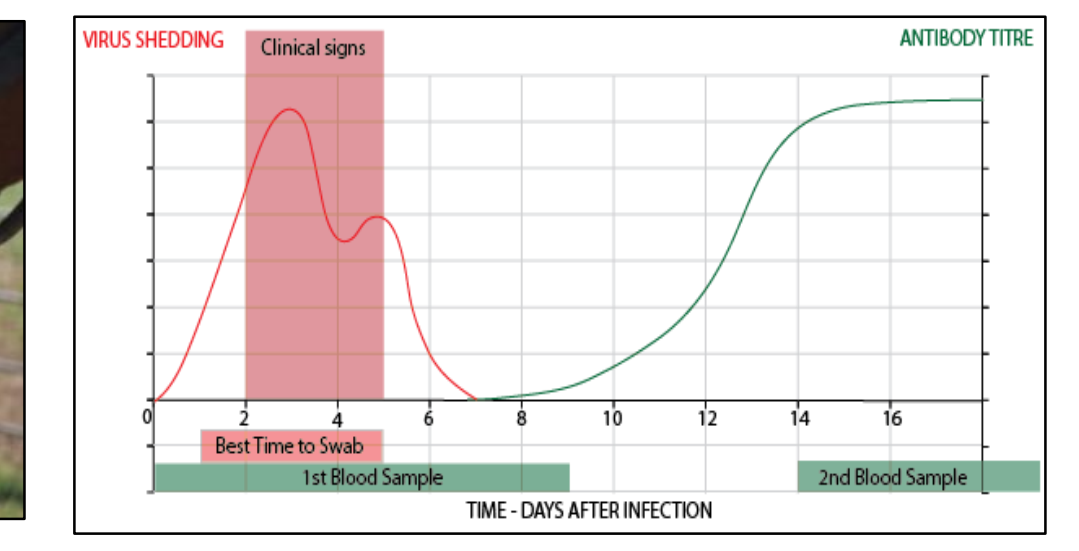


Fig. 4: Intervalos de toma de muestras pareadas. Imagen tomada de Animal Health Trust, Centre for Preventive Medicine (UK)



Fig. 5: Aislamiento del virus en huevos embrionados de gallina.

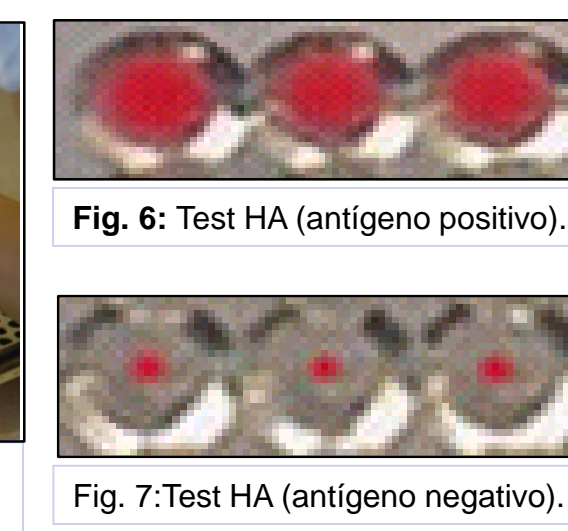


Fig. 6: Test HA (antígeno positivo).

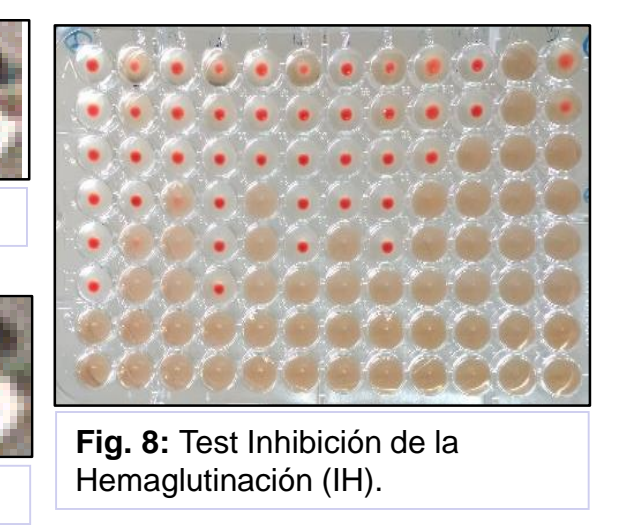


Fig. 8: Test Inhibición de la Hemaglutinación (IH).

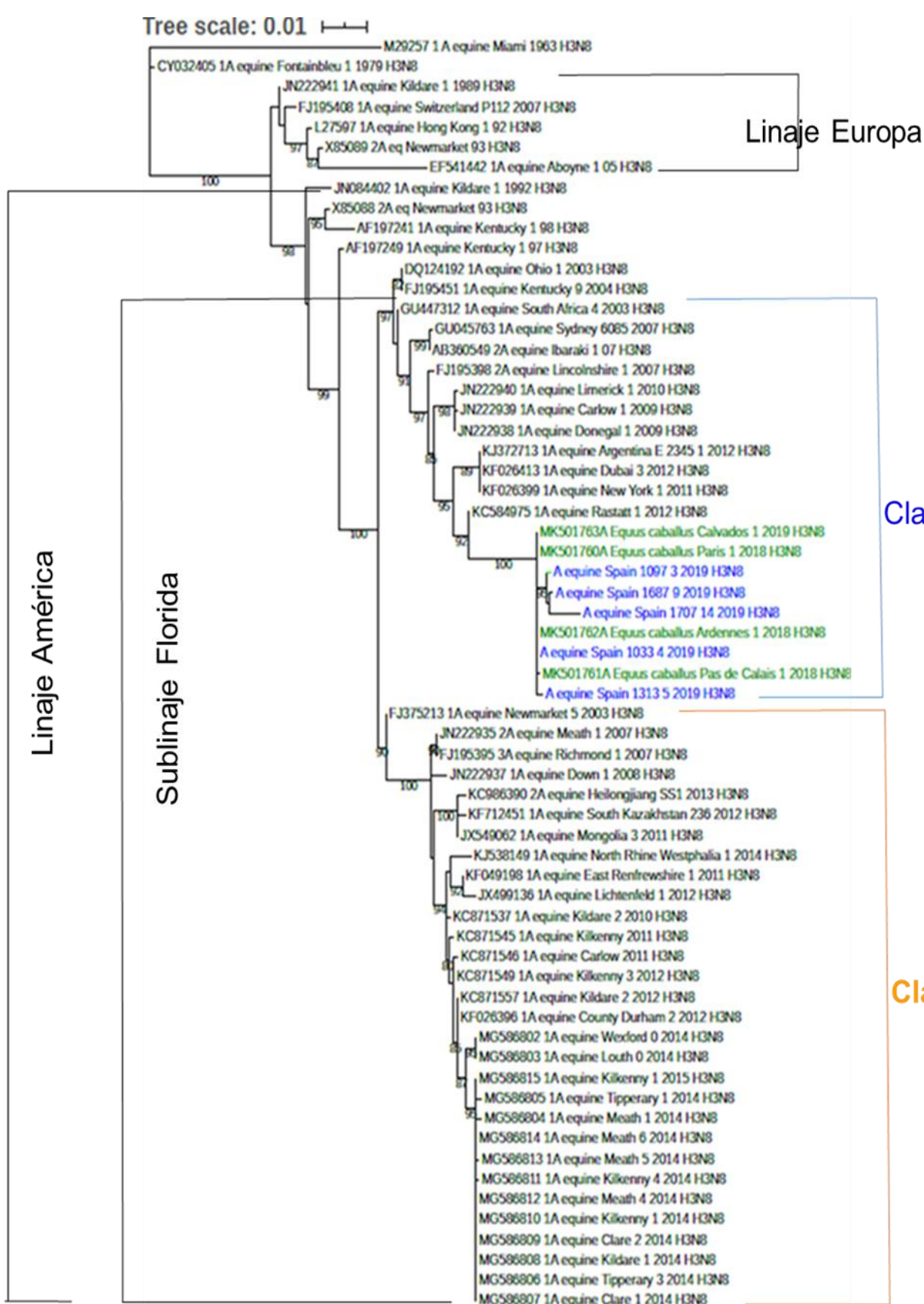


Fig. 9: Análisis filogenético de las secuencias del gen de la HA del virus Influenza equina. (Las de virus H3N8, que actualmente circulan en Europa, 2018-19, se muestran en verde y 5 aislados españoles de 2019 en azul). Se ha utilizado el método de máxima verosimilitud (ML) para la secuencia de nucleótidos y el programa PhyML (v3.0). Las distancias genéticas se calcularon utilizando el modelo de sustitución de dos parámetros Kimura y el soporte estadístico para la topología del árbol se evaluó mediante remuestreo bootstrap (1000 repeticiones) de las alineaciones múltiples.

| Registro | CCAA | Nº Hisopo nasofaríngeo | PCR (Ct) | Aislamiento | Nº suero | Detección de Ac- IH - Título de Ac | | |
|----------|---------------|------------------------|-------------|-------------|----------|------------------------------------|-----------------|---------|
| | | | | | | Ag H3N8 Clade 1 | Ag H3N8 Clade 2 | Ag H7N7 |
| 1033/19 | País Vasco | 1 | 22,6 | H3N8 | 1 | 1/4-1/8 | 1/4-1/8 | Neg |
| | | 2 | 16,5 | | | 1/4-1/8 | 1/4-1/8 | |
| | | 3 | 23,2 | | | 1/4-1/8 | 1/4-1/8 | |
| | | 4 | 19,4 | | | 1/4-1/8 | 1/4-1/8 | |
| 1097/19 | Valencia | 1 | 24 | Neg | 2 | Neg | Neg | Neg |
| | | 2 | 24,6 | | | Neg | Neg | |
| 1313/19 | Navarra | 1 | 33 | Neg | 1 | 1/16-1/32 | 1/16 | Neg |
| | | 2 | 33,9 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 3 | 32,9 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 4 | 36,9 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 5 | 22 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 6 | 21,5 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| 1429/19 | Castilla-León | 1 | 28,9 | Neg | 10 | 1/128-1/256 | 1/32-1/64 | Neg |
| | | 2 | Neg | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 3 | Neg | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 4 | 36,8 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 5 | Neg | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 6 | 33,4 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 7 | Neg | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 8 | 33,9 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 9 | Neg | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 10 | Neg | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| 1617/19 | Castilla-León | 1 | 1/16 | Neg | 1 | 1/16 | 1/32 | Neg |
| | | 2 | 1/16 | | | 1/32 | | |
| | | 3 | 1/16 | | | 1/32 | | |
| | | 4 | 1/16 | | | 1/32 | | |
| | | 5 | 1/32 | | | 1/16 | | |
| | | 6 | 1/16 | | | 1/8-1/16 | | |
| 1679/19 | Andalucía | 1 | 38,6 | Neg | 7 | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | Neg |
| | | 2 | 30,8 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 3 | Neg | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 4 | 35,9 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 5 | Neg | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| 1687/19 | Andalucía | 1 | 26,6 | H3N8 | 1 | 1/32-1/64 | 1/16-1/32 | Neg |
| | | 2 | 35,8 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 3 | 28,6 | | | 1/64-1/128 | 1/64-1/128 | |
| | | 4 | Neg | | | 1/8 | 1/8-1/16 | |
| 1707/19 | Galicia | 1 | Neg | Neg | 1 | 1/32-1/64 | 1/16-1/32 | Neg |
| | | 2 | 27,7 | | | 1/8-1/16 | 1/8-1/16 | |
| | | 3 | 25,2 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 4 | 21,7 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| | | 5 | 23 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| 1760/19 | Galicia | 1 | 30,4 | H3N8 | 1 | 1/32-1/64 | 1/16-1/32 | Neg |
| | | 2 | 32,7 | | | 1/8-1/16 | 1/8-1/16 | |
| | | 3 | 33,4 | | | 1/4-1/8 | 1/4-1/8 | |
| | | 4 | 28,3 | | | 1/32-1/64 | 1/32-1/64 | |
| 1858/19 | Andalucía | 1 | Neg | Neg | 1 | 1/32-1/64 | 1/16-1/32 | Neg |
| | | 2 | 1/256-1/512 | | | 1/128-1/256 | | |
| | | 3 | 1/256-1/512 | | | 1/512 | | |
| | | 4 | 1/512 | | | 1/256-1/512 | | |
| 1926/19 | Galicia | 1 | Neg | Neg | 1 | 1/128-1/256 | 1/256-1/512 | Neg |
| | | 2 | Neg | | | 1/128-1/256 | 1/256-1/512 | |
| | | 3 | Neg | | | 1/128-1/256 | 1/256-1/512 | |
| 2135/19 | Galicia | 1 | Neg | Neg | 1 | 1/128-1/256 | 1/256-1/512 | Neg |
| | | 2 | Neg | | | 1/128-1/256 | 1/256-1/512 | |
| | | 3 | Neg | | | 1/128-1/256 | 1/256-1/512 | |
| 2374/19 | Valencia | 1 | Neg | Neg | 1 | 1/32-1/64 | 1/16-1/32 | Neg |
| | | 2 | Neg | | | 1/64-1/128 | 1/64-1/128 | |
| | | 3 | Neg | | | 1/64-1/128 | 1/64-1/128 | |

Los Ct inferiores a 35 se consideran resultados positivos, por encima de este valor serían no concluyentes.

CONCLUSIONES:

- Los métodos moleculares empleados han mostrado ser eficaces para la detección del virus de la Influenza equina en hisopos nasofaríngeos.
- El aislamiento del virus demostró ser un método con un buen rendimiento en situaciones de enfermedad clínica.
- El método serológico de Inhibición de la Hemaglutinación ha mostrado ser un método útil para conocer el estado inmune de los animales, confirmar los casos clínicos y conocer la prevalencia de la infección.
- El análisis filogenético del gen de la Hemaglutinina indica que los aislados obtenidos entre marzo y mayo de 2019 son idénticos entre sí y están filogenéticamente muy próximos a los virus actualmente circulantes en países europeos de nuestro entorno, H3N8 sublinaje Florida clade 1.

Agradecimientos: A todos los miembros del Dpto. de Virología 1 y Dpto. de Diagnostico Molecular del Laboratorio Central de Veterinaria, Algete.

BIBLIOGRAFÍA:

- Animal HEALTH Trust – Equiflunet - Laboratorio de referencia de la Influenza equina – OIE.
- Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2019.
- Gildea, S.; Quinlivan, M.; Arkins, S.; Cullinane, A. (2012). The molecular epidemiology of equine influenza in Ireland from 2007–2010 and its international significance. *Equine Vet. J.* 2012, 44, 387–392.
- Gildea, S.; Fitzpatrick, D.A.; Cullinane, A. (2013). Epidemiological and virological investigations of equine influenza outbreaks in Ireland (2010–2012). *Influ. Other Respir. Viruses* 2013, 7 (Suppl. 4), 61–72.
- Gildea, S.; Garvey, M.; Lyons, P.; Lyons, R.; Gahan, J.; Walsh, C.; Cullinane, A. (2018). Multifocal Equine Influenza Outbreak with Vaccination Breakdown in Thoroughbred Racehorses. *Pathogens* 2018, 7, 43.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, Volume 59, 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- Heine, H.G., Trinidad, L., Selleck, P. and Lowther, S. (2007). Rapid Detection of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus by TaqMan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases*, 51: 370-372.
- Romain Paillot et al (2019). Floride clade 1 equine influenza virus in France. *Veterinary Record*. 10.1136/vr.11203 17/01/2019.
- Shu, Y., McCauley, J. (2017). GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality. *EuroSurveillance*, 22(13) doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494 PMID: PMC5388101.
- Singh, R.K., Dhama, K., Karthik, K., Khandia, R., Munjal, A., Khurana, S.K., Chakraborty, S., Malik, W.S., Virmani, N., Singh, R., Tripathi, B.N., Munir, M., and van der Kolk, J.H. (2018). A Comprehensive Review on Equine Influenza Virus: Etiology, Epidemiology, Pathobiology, Advances in Developing Diagnostics, Vaccines, and Control Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 9 doi: 10.3389/fmicb.2018.01941.

