

LA GRIPE AVIARIA

¿Una nueva amenaza pandémica?





Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Serrano, 117. 28006 Madrid. Spain

Phone: +34 91 585 50 00

www.csic.es

© Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 2006

Área de Cultura Científica

Depósito legal: M-3470-2006

Imprime Gráficas Mafra S.L.

Tel: 91 797 74 19

LA GRIPE AVIARIA

¿UNA NUEVA AMENAZA PANDÉMICA?

Jordi Figuerola

Estación Biológica de Doñana (CSIC)

Adolfo García-Sastre

Mount Sinai School of Medicine, New York

Juan Ortín*

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)

Pilar Pérez-Breña

Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III)

Agustín Portela

Agencia Española del Medicamento

Gustavo del Real

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

Ramón Soriguer

Estación Biológica de Doñana (CSIC)

(*) Coordinador

PRÓLOGO

En el Consejo Superior de Investigaciones Científicas tenemos un obvio compromiso profesional con la producción de conocimientos científicos, pero también tenemos un compromiso social con nuestros conciudadanos, a quienes tenemos la obligación de ofrecer informaciones contrastadas, que les permitan disipar dudas y tomar decisiones mejor informadas. No se trata sólo, así pues, de producir o de adquirir conocimientos, sino también de integrarlos y de darlos a conocer. Tratamos de ser algo así como artesanos del conocimiento experto, que ponemos a disposición de la sociedad que nos mantiene.

El documento que aquí se presenta : " La Gripe Aviaria: ¿Una nueva amenaza pandémica?" pertenece a este género. No pretende aportar novedades científicas, sino ofrecer conocimientos integrados sobre un tema de justificada preocupación social.

El público al que va dirigido, no es quizás el gran público: no son los centenares de miles de lectores de periódicos, pero sí los periodistas especializados; no son los millones de estudiantes de primaria, pero sí sus profesores.

La interrogación que forma parte del título de este documento quiere decir, simplemente, que los científicos no sabemos si se va a producir una pandemia, provocada por la llamada gripe aviaria, o no: no somos más fiables que otros profesionales a la hora de hacer profecías o, mejor dicho, somos tan falibles como todos los demás. *Prediction is very risky, especially about the future*, "toda predicción es muy arriesgada, especialmente sobre el futuro", y si todos los científicos se hubieran atendido a esta prudente reflexión de Niels Bohr, se habrían evitado muchas alarmas injustificadas y muchas profecías incumplidas.

Es verdad que no podemos anticipar el futuro, pero sabemos bastantes cosas del presente, porque continuamente estamos tratando de generar nuevos conocimientos sobre la realidad. De hecho, lo que hay de cierto sobre, por ejemplo, la gripe aviaria, lo sabemos nosotros y no los mercaderes, los agoreros o los profetas apocalípticos, que siempre proliferan en momentos de incertidumbre.

Se trata, pues, de un documento de carácter formativo, educativo y divulgativo, pero de nivel medio, porque sus contenidos son, con frecuencia, bastante técnicos pero comprensibles. Como dijo Einstein en cierta ocasión, *everything should be made as simple as possible, but not simpler*, "todo debería hacerse lo más simple posible, pero ni una pizca más". Esperamos, con todo, que su nivel de tecnicismo no sea un impedimento para que resulte útil a los lectores a los que va dirigido.

Al fin y al cabo, han transcurrido exactamente cien años desde que le concedieron el premio Nobel de medicina a don Santiago Ramón y Cajal y, afortunadamente, la España de hoy tiene tan poco que ver con la de entonces que, en gran medida se ha cumplido ya su deseo de que "en el más breve plazo posible, nuestra Patria colabore, en la medida de sus fuerzas mentales y de sus recursos financieros, en la empresa de la cultura y civilización universales".

Carlos Martínez Alonso

Presidente del CSIC

INDICE

1. Introducción	7	5. La gripe aviaria en las aves domésticas	26
2. Biología General de los virus de la gripe	8	• La gripe aviaria como problema clásico	
• Estructura de la partícula viral y del genoma	8	de sanidad animal	26
• Reconocimiento del receptor	9	• Prevención y control de la gripe aviaria	29
• Entrada del virión en la célula	10	• Carácter zoonótico de la gripe aviaria	31
• Mecanismos de replicación	10	• La gripe en otros animales domésticos	31
• Morfogénesis y liberación de viriones progenie	12	6. Detección e identificación	
• Mecanismos de variación viral	12	de virus gripales. Sistemas de alerta	32
• Los virus gripales como cuasiespecies	13	• Descripción del cuadro clínico de la gripe	
3. Factores que determinan		aviaria en humanos	32
la patogenicidad viral	13	• Detección de la infección humana	
• Factores genéticos virales implicados		por gripe aviaria	34
en patogenicidad	13	• Diagnóstico	35
• Factores genéticos virales que determinan		• Caracterización de los virus	40
el rango de huésped	14	• Red para la vigilancia de la gripe en España	41
• Evolución viral	16	• Preparación ante una posible pandemia	42
• Saltos de huésped	17	7. Prevención y Terapia	46
• Epidemias anuales y pandemias	17	• Vías de contagio	46
• Factores determinantes para la aparición		• Reacción inmune	46
de pandemias	18	• Vacunas inactivadas y atenuadas	47
• Historia natural de los virus H5N1 recientes	19	• Vacunas pandémicas	49
4. Ecología viral	20	• Vías alternativas de vacunación	50
• Las aves silvestres como reservorios		• Antivirales	52
del virus de la gripe	20	• Aparición de virus resistentes, mecanismos de	
• Posibilidades para la dispersión de virus		resistencia y patogenicidad de virus resistentes	55
gripales por aves migratorias	23	8. Referencias	58

■ 1. Introducción

Los virus de la gripe son agentes patógenos altamente variables que contienen un genoma de RNA segmentado y ocasionan en el hombre infecciones respiratorias en forma de epidemias anuales y pandemias ocasionales. Las pandemias gripales son producidas por virus nuevos para la población y afectan a toda la Humanidad en un período corto de tiempo. Durante el siglo XX se registraron tres pandemias gripales, en 1918, 1957 y 1968, la primera de las cuales fue la más importante y ocasionó entre 20 y 40 millones de muertes.

Desde 1997 se han registrado infecciones en humanos producidas por virus gripales típicos de la enfermedad en pollos, del subtipo H5N1, que normalmente ocasionan brotes altamente contagiosos y letales en aves de corral. Estas infecciones en humanos han tenido lugar en diversos países del sudeste asiático, donde los virus H5N1 han ocasionado brotes recurrentes de enfermedad en aves domésticas. Además, estos virus también se han

establecido en poblaciones de aves silvestres de la región. Desde allí, los virus H5N1 se han extendido al oeste de Asia y a países de Europa oriental, en forma de brotes limitados de enfermedad en aves y algunos casos en humanos.

Ante el peligro de que los virus gripales H5N1 den origen a una nueva pandemia, alertado por la Organización Mundial de la Salud en varias ocasiones, el CSIC ha decidido presentar un documento institucional en el que se resume la situación desde un punto de vista científico. En este documento se discute de forma sucinta la Biología básica del virus, sus mecanismos de variación y las bases de su patogenicidad y de su capacidad para cambiar de huésped. Además, se discute la Ecología viral y la implicación de las aves silvestres como reservorio general de los virus gripales, así como las características de la enfermedad en aves domésticas. De especial relevancia son los apartados sobre el sistema de alerta temprana para la detección y caracterización de virus potencialmente pandémicos, tanto a nivel español como europeo y mundial. Además, se resumen las características

de las vacunas disponibles, los requerimientos para preparar las vacunas pandémicas y el papel de los medicamentos antivirales para la profilaxis y la terapia de las infecciones en humanos.

■ 2. Biología general de los virus de la gripe

Estructura de la partícula viral y del genoma

Los viriones gripales son partículas pleomórficas de apariencia esférica con una envuelta lipídica externa que deriva de la membrana celular (Figura 1). Por debajo de la membrana se encuentra una capa constituida por la proteína matriz (M1), que es el soporte estructural de la partícula, y en su interior un conjunto de ribonucleoproteínas (vRNPs) que constituyen el genoma del virus (Lamb and Krug, 1996). Las características antigénicas de la proteína M1 y de las vRNPs permiten distinguir 3 tipos serológicos virales, A, B y C, de los que los tipo A son los más relevantes clínicamente y son los únicos que han producido pandemias. El tex-

to que sigue se refiere esencialmente a los virus gripales tipo A.

El genoma de estos virus está formado por 8 piezas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa, es decir, no pueden ser traducidos directamente a proteína. Las secuencias de los extremos de cada RNA están conservadas entre sí y entre todos los virus tipo A, y son parcialmente complementarias. Cada segmento de RNA está asociado a la polimerasa viral, que es un complejo de tres subunidades distintas, PB1, PB2 y PA, mediante interacción con los extremos del RNA y está protegido por asociación a monómeros de la nucleoproteína (NP), uno de los componentes mayoritarios en el virión (Figura 3) (Lamb and Krug, 1996).

En la superficie del virión, e insertadas en su membrana, se encuentran dos glicoproteínas, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), cuya estructura determina los subtipos serológicos que podemos definir entre los virus gripales tipo A. Así, existen 16 subtipos diferentes de HA

Representación esquemática de una partícula del virus de la gripe

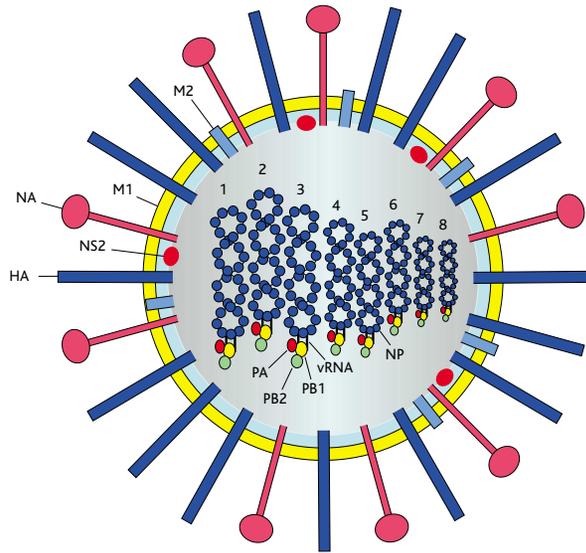


Figura 1. Se representa la membrana viral (amarillo) con las glicoproteínas mayoritarias (hemaglutinina –HA- y neuraminidasa –NA-) y la proteína M2. La capa de proteína M1 se representa en azul claro, con las proteína NS2 (NEP) asociada. En el interior se representan 8 ribonucleoproteínas con la nucleoproteína (NP) y las subunidades de la polimerasa (PB1, PB2 y PA).

(H1-H16) y 9 de NA (N1-N9). Además, en el virión existen cantidades pequeñas de otra proteína denominada M2, que constituye un canal iónico dependiente del pH del medio y NEP, que

está implicada en la exportación de vRNPs del núcleo (véase más adelante).

Además de las proteínas citadas, los virus gripales tipo A expresan otras proteínas importantes para su replicación o su interacción con el huésped, que no están presentes en la partícula viral: La proteína NS1 une RNA de doble cadena, modula la replicación viral y es esencial para bloquear la respuesta celular a la infección, que está mediada por interferón (García-Sastre, 2001). La proteína PB1-F2 parece modular la apoptosis o muerte celular programada como consecuencia de la infección (Chen et al., 2001).

Reconocimiento del receptor

Los receptores celulares de los virus de la gripe son residuos de ácido siálico que se encuentran en glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular y están presentes en todas las células. La HA del virus es responsable de la unión al receptor, mediante un sitio de reconocimiento específico y conservado que se encuentra en su región globular externa (Wiley and Skehel, 1987). Por su par-

La hemaglutinina viral

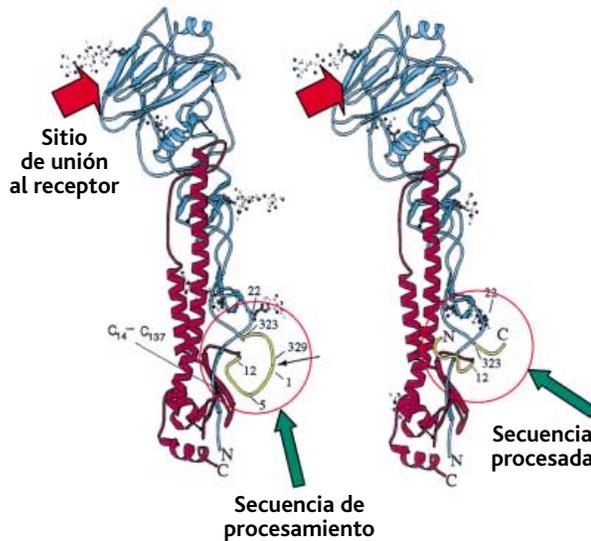


Figura 2. Representación esquemática de la estructura tridimensional del monómero de hemaglutinina con sus subunidades HA-1 (azul) y HA-2 (rojo). Se indica la posición de sitio de reconocimiento del receptor celular y de la secuencia de activación por procesamiento proteolítico. A la izquierda, estructura no procesada y a la derecha la estructura activada.

te, la NA también puede reconocer el receptor mediante un sitio análogo y además, es capaz de romper la unión del ácido siálico a las glicoproteínas celulares, por lo que puede liberar el virus de la superficie celular (Colman et al., 1983).

Entrada del virión en la célula

Los viriones adheridos a la superficie celular son internalizados por endocitosis, es decir mediante formación de vesículas que los contienen en su interior. La liberación de las vRNPs virales al citoplasma celular requiere la fusión de la membrana vesicular y la del virus, un paso esencial dependiente de la HA y de la acidificación de la vesícula. La HA cambia drásticamente su conformación a pH ácido e induce la fusión de las membranas (Bullough et al., 1994). Además, en estas condiciones el canal iónico M2 permite la acidificación del interior del virión, hecho que contribuye a la disociación de las vRNPs virales de la estructura de proteína M1 que las rodea (Pinto et al., 1992).

Mecanismos de replicación

Una vez las vRNPs son liberadas en el citoplasma, éstas son transportadas rápidamente al núcleo celular, donde tienen lugar tanto su transcripción para generar los RNA mensajeros (mRNAs) virales como su replicación. En una primera etapa, la polimerasa asociada a cada RNP genera mRNAs, cuya traducción es esencial para continuar la infección.

Modelos tridimensionales de la polimerasa y la ribonucleoproteína

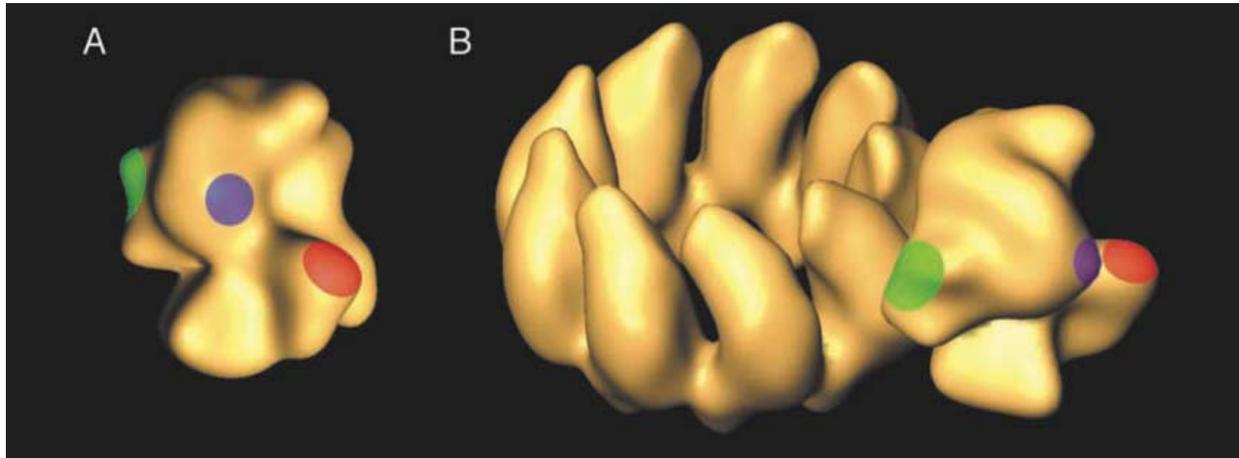


Figura 3. Se presentan los modelos tridimensionales de la polimerasa (A) y la ribonucleoproteína (B), determinados por microscopía electrónica y reconstrucción tridimensional de imágenes (Area et al., 2004; Martín-Benito et al., 2001). Se indica la localización de las subunidades PB1 (verde), PB2 (rojo) y PA (azul).

Ello es debido a que las nuevas proteínas virales son necesarias para producir la replicación de las vRNPs. El primer paso de replicación consiste en la generación de RNPs complementarias (cRNPs) a las que entraron en la célula, es decir son estructuralmente similares pero su RNA tiene la polaridad positiva. Estas cRNPs son intermediarios en la replicación cuya función es servir de molde para la posterior producción de grandes cantidades de

vRNPs idénticas a las paternas (Neumann et al., 2004; Portela and Digard, 2002; Portela et al., 1999).

Es importante destacar que la replicación de cada uno de los 8 tipos de vRNPs virales es independiente, por lo que vRNPs provenientes de dos virus que infecten la misma célula pueden mezclarse fácilmente en la progenie viral resultante de la infección.

Morfogénesis y liberación de viriones progenie

Las nuevas vRNPs generadas por replicación son primero exportadas desde el núcleo al citoplasma celular y posteriormente transportadas cerca de la membrana plasmática celular. Independientemente, los mRNAs correspondientes a la HA y NA son traducidos y las proteínas correspondientes son procesadas y transportadas a regiones específicas de la membrana denominadas *rafts*. La interacción de la proteína M1 con las regiones citoplásmicas de HA y NA, por un lado, y con las nuevas vRNPs por otro, permite la formación de nuevos viriones que se liberan al medio por gemación. En cada partícula viral está presente una copia de cada tipo de vRNP y su asociación específica viene determinada por interacciones entre secuencias de empaquetamiento que existen en cada uno de los segmentos de RNA (Fujii et al., 2003).

Para que los viriones liberados sean infecciosos, han de ser activados por proteólisis en su HA. Esta glicoproteína posee una secuencia de activación que ha de ser cortada por una proteasa celular para que

la HA pueda inducir la fusión de membranas en un ciclo posterior de infección (Figura 2)(Klenk et al., 1975). La secuencia de activación es variable de unas cepas virales a otras, lo que permite que sean activadas por diferentes proteasas celulares. Cuando esta secuencia puede ser procesada por proteasas ubicuas el virus puede replicar en cualquier tipo celular y por ello puede propagarse a distintos tejidos en el animal infectado. Si la secuencia de activación sólo puede ser procesada por proteasas específicas el rango de tejidos donde el virus puede multiplicarse es más limitado (Steinhauer, 1999). Los virus de la gripe de alta patogenicidad en aves se caracterizan por la presencia de una secuencia de activación en su HA que es reconocida por proteasas ubicuas.

Mecanismos de variación viral

Los virus de la gripe, como todos los virus que contienen RNA, son altamente variables debido a la baja fidelidad de copia de su maquinaria de replicación. Se ha estimado que la frecuencia de mutación por posición en la secuencia de los genes virales es aproximadamente 10^{-4} - 10^{-5} (Parvin

et al., 1986; Suárez and Ortín, 1994). Dado que la secuencia completa del genoma contiene aproximadamente 13600 nucleótidos, esto significa que prácticamente TODOS los virus de la progenie contienen algún cambio respecto de una secuencia teóricamente silvestre.

En el caso de los virus de la gripe, esta generación de diversidad se ve complementada por la posibilidad de mezclar los genes virales en los viriones de la progenie, como consecuencia del carácter segmentado de su genoma. Así, si una célula resulta infectada por dos virus diferentes, las vRNPs de ambos pueden mezclarse con gran facilidad, generando multitud de posibles combinaciones entre ellas.

Los virus gripales como cuasiespecies

Como consecuencia de los mecanismos de variación indicados, hemos de considerar los virus gripales como mezclas muy complejas de diferentes partículas virales (cuasiespecies) (Domingo and Holland, 1997), dado que cualquier muestra viral es en realidad un conjunto diverso de individuos

diferentes. Esta tremenda heterogeneidad genética permite que los virus gripales puedan evolucionar rápidamente para adaptarse a circunstancias o entornos cambiantes. Ello es así porque en cualquier muestra de virus se pueden encontrar partículas virales con capacidad para multiplicarse en unas circunstancias diferentes, como por ejemplo en presencia de anticuerpos neutralizantes, a diferentes temperaturas o en distintas células huésped.

■ 3. Factores que determinan la patogenicidad viral

Factores genéticos virales implicados en patogenicidad

La infección en humanos por parte del virus de la gripe A causa un proceso febril respiratorio cuya severidad varía dependiendo de factores tanto del huésped como de la cepa particular del virus. Con respecto al huésped, tanto las personas de edad avanzada como los niños de corta edad tienen mayor riesgo de desarrollar una enfermedad grave.

La gripe aviaria ¿una nueva amenaza pandémica?

En estos casos la gripe puede presentar patología pulmonar que puede progresar a neumonía primaria (causada directamente por el virus) o secundaria (causada por una segunda infección oportunista de origen bacteriano) (Wright and Webster, 2001). Con respecto al virus, se sabe que hay varios genes virales que modulan su virulencia. En las cepas de virus de la gripe con alta patogenicidad en humanos, como los virus H5N1 aislados recientemente de casos letales, o como los virus humanos de 1918, cabe destacar como determinantes de alta patogenicidad los genes que codifican la hemaglutinina, la neuraminidasa, la proteína no estructural NS1 y la polimerasa viral (Hatta et al., 2001; Tumpey et al., 2005). Debido a su capacidad de modular la respuesta celular, se piensa que las proteínas virales no estructurales NS1 y PB1-F2 juegan un papel importante en la patogenicidad viral. Además, ya que la mayor parte de los genes virales cooperan entre sí durante la replicación del virus, las constelaciones de genes que dan lugar a altos niveles de replicación están normalmente asociadas con una mayor virulencia.

Evolución y propagación de los virus de la gripe

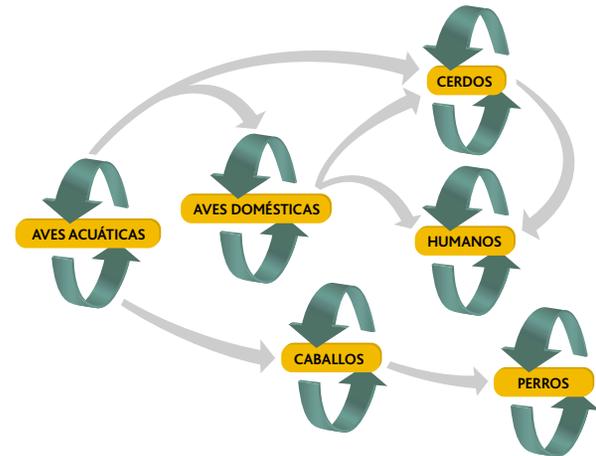


Figura 4. Se indican esquemáticamente los huéspedes naturales para la multiplicación de virus gripales y su transferencia entre especies.

Factores genéticos virales que determinan el rango de huésped

Como se describe más adelante, los virus tipo A persisten en la naturaleza en el reservorio de aves silvestres y pueden afectar una variada gama de especies: humanos, cerdos, caballos, aves y más recientemente perros (Figura 4). Normalmente, cepas de virus adaptadas a propagarse en una determinada especie no se propagan en otras especies.



Aunque no se saben todavía todos los factores que se requieren para el salto de una cepa viral de una especie a otra, está bastante bien establecido que un factor importante que condiciona la especificidad de huésped es el receptor al que se une la hemaglutinina viral para iniciar la infección (Russell and Webster, 2005). Los residuos de ácido siálico del aparato digestivo de las aves, donde el virus se replica, están en su mayoría unidos mediante enlaces a2,3, mientras que en el caso del aparato respiratorio de humanos, lo están mediante enlaces a2,6. De manera consistente, la hemaglutinina de los virus aviáres reconoce preferentemente ácidos siálicos unidos mediante enlaces a2,3, y la de virus humanos, a2,6. Los virus H5N1 recientes reconocen preferentemente ácidos siálicos unidos mediante enlaces a2,3, lo que indica que no están adaptados a humanos (Harvey et al., 2004). Además de la hemaglutinina, existen otros genes virales que requieren adaptación a distintos huéspedes, como por ejemplo los genes de la polimerasa, pero los mecanismos de adaptación son menos conocidos. Cabe resaltar la presencia del aminoácido lisina en la posición 627 del gen PB2 en virus

humanos (Subbarao et al., 1993). Los virus H5N1 aislados de pájaros tienen un glutámico en esta posición, mientras que varios de los virus H5N1 aislados de humanos tienen una lisina (Hatta et al., 2001). Sin embargo, este cambio por sí solo no es capaz de conseguir la propagación entre humanos del virus H5N1.

Evolución viral

Los virus de la gripe humanos se encuentran bajo evolución constante, caracterizada por la acumulación de mutaciones en todos sus genes, pero especialmente en la hemaglutinina y neuraminidasa. Estas dos proteínas virales son las que determinan la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el virus. Mutaciones en estas proteínas son seleccionadas para que el virus resultante logre reinfectar humanos que han sido previamente expuestos a cepas anteriores de virus de la gripe, y que por lo tanto han desarrollado anticuerpos que previenen re-infección por la misma cepa. Además de estos cambios puntuales (deriva antigénica- *antigenic drift*-) que con el tiempo dan lugar a diferencias significativas en

antigenicidad, los virus humanos de la gripe A adquieren cada pocas décadas cambios drásticos de antigenicidad (salto antigénico -*antigenic shift*-). Cuando esto ocurre, el virus resultante contiene determinantes antigénicos totalmente nuevos, es decir, cambia de subtipo antigénico, contra los que no existe inmunidad previa en humanos. Esto da lugar a una pandemia, caracterizada por una elevada morbilidad y mortalidad debido a que una gran parte de la población resulta infectada durante un período relativamente corto de tiempo (Wright and Webster, 2001).

Saltos de huésped

Mientras que en humanos existen en la actualidad dos subtipos antigénicos de virus de la gripe A (H1N1 y H3N2), en aves existen 16 subtipos antigénicos de hemaglutinina y 9 de neuraminidasa. El salto antigénico del virus de la gripe A ocurre cuando una cepa viral con un subtipo de hemaglutinina aviar (y a veces de neuraminidasa) previamente no existente en las cepas humanas en circulación adquiere la capacidad de propagarse en humanos. Esto puede ocurrir de dos for-

mas. O bien un virus de gripe humana intercambia parte de sus genes con un virus de gripe aviaria, y como resultado, se origina un nuevo virus con varios genes humanos y otros aviares, entre los cuales está la hemaglutinina. Este nuevo virus probablemente necesite pocos cambios para lograr adaptarse completamente a humanos, ya que parte de su información genética está derivada de un virus humano. Para que este proceso tenga lugar, dos cepas de virus, una humana y otra aviar, tienen que infectar un mismo huésped donde intercambian su información genética. Tanto el cerdo como la codorniz y el faisán se han propuesto como este huésped intermedio, debido a que son especies permisivas para virus aviares y humanos. La segunda forma posible de producirse un salto antigénico consiste en la introducción completa de un virus aviar en humanos previa adaptación de este virus en humanos o en otro huésped intermedio (Russell and Webster, 2005).

Epidemias anuales y pandemias

En la actualidad tres virus de la gripe son causantes de epidemias anuales en humanos: virus de la

gripe A H1N1 y H3N2, y virus de la gripe B (Figura 5). Normalmente, cada año uno de los tres virus es más prevalente que los otros, pero en general los virus H1N1 causan menos infecciones que los virus H3N2 o los virus B. Los virus de la gripe C causan infecciones respiratorias de menor severidad en humanos. Durante la pandemia de 1957, los virus H1N1 fueron reemplazados en humanos por un virus H2N2 cuyos genes estaban derivados del virus H1N1 previamente circulante, con la excepción de aquellos que codifican la hemaglutinina, neuraminidasa y la polimerasa PB1, que fueron adquiridos de una cepa aviar. Durante la pandemia de 1968, los virus H2N2 fueron reemplazados por un virus H3N2, que de nuevo adquirió dos genes de una cepa aviar, hemaglutinina y PB1. En 1977, los virus H1N1 volvieron a aparecer en humanos, pero eso no ocasionó la desaparición de los virus H3N2 ni dió lugar a una pandemia. Por tanto, no ha habido una pandemia de gripe en humanos desde 1968. Aparte de las pandemias de 1957 y de 1968, en 1918 la Humanidad sufrió una pandemia ocasionada por un virus H1N1, que tuvo niveles de mortalidad mucho más elevados que las pandemias

de 1957 y de 1968. Recientemente, se ha logrado obtener la secuencia del virus de 1918 a partir de muestras de tejidos de víctimas que murieron de gripe en esa pandemia. La secuencia de este virus ha revelado una similitud cercana a virus de aves, y se ha postulado que el virus humano de 1918 se originó por completo a partir de una cepa aviar. Sin embargo, no existen pruebas concluyentes de que uno o más genes del virus de 1918 no sean derivados de cepas humanas anteriores al 1918, de las cuales no existen muestras conocidas en la actualidad.

Factores determinantes para la aparición de pandemias

Las pandemias de virus de la gripe se caracterizan por la adaptación en humanos de un virus que contiene determinantes antigénicos derivados de cepas de virus de aves para los cuales no existe inmunidad en humanos. Se sabe que virus de los subtipos H1, H2 y H3 pueden ocasionar pandemias en humanos. Ya que en la actualidad existen virus H1 y H3 en humanos, la próxima pandemia podría ser debida a un virus H2. Es también posible

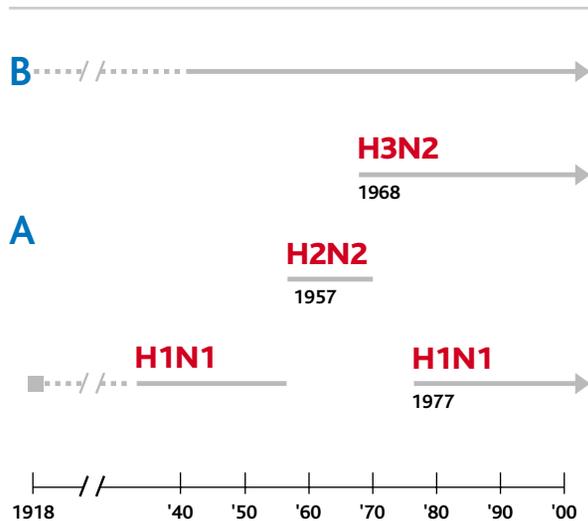


Figura 5. Epidemias y pandemias de los virus de la gripe en humanos desde el siglo pasado.

que un virus perteneciente al resto de los 13 subtipos adicionales de hemaglutinina presentes en aves sea el causante de la próxima pandemia. Sin embargo, no se sabe con seguridad si todos los subtipos tienen la capacidad de adaptarse a humanos. Para la generación de un nuevo virus pandémico, se necesitan superar al menos tres barreras: infección, replicación y propagación en humanos. No se conocen todos los factores necesarios para superar

estas tres barreras a la vez, y por lo tanto es imposible prever en este momento cuándo, dónde y cómo se va a originar una nueva cepa pandémica, y si va a ser una cepa H5 o no. Pero lo que sí se puede decir con certeza es que tarde o temprano ocurrirá una pandemia, ya que pandemias de virus de la gripe han sido documentadas periódicamente en la historia de la Humanidad.

Historia natural de los virus H5N1 recientes

En 1997, un virus de alta patogenicidad en pollos perteneciente al subtipo H5N1 fue identificado en los mercados de aves vivas de Hong Kong (Subbarao et al., 1998). Este virus ocasionó 18 casos de infecciones documentadas en humanos, de los cuales murieron 8 personas. El virus fue eliminado de los mercados de Hong Kong gracias al sacrificio de todas las aves domésticas de esta ciudad. Sin embargo, ahora se sabe que los genes de este virus continuaron circulando en distintas cepas de virus de la gripe en aves silvestres y domésticas. En 2003 y 2004, los virus H5N1 aparecieron de nuevo en granjas de pollos en distintos países asiáticos, entre los cuales se encuentran

Corea, China, Japón, Vietnam, Tailandia e Indonesia. Estos nuevos virus H5N1 son descendientes de los aislados en Hong Kong en 1997, aunque su composición genética y su antigenicidad ha sufrido cambios significativos (Li et al., 2004). Los virus H5N1 siguen circulando actualmente en aves silvestres y comerciales en distintos países, y se han documentado más de 100 casos de infecciones esporádicas en humanos desde el 2004, que frecuentemente han producido enfermedad grave e incluso la muerte de los pacientes, aunque aún no se sabe con seguridad si existen muchos más casos de infecciones asintomáticas en humanos. A pesar de que se ha detectado la transmisión ocasional entre humanos, no parece que el virus sea capaz de propagarse eficientemente de humano a humano hasta el momento, un factor necesario para la iniciación de una pandemia. El virus H5N1 continúa propagándose a otros países en especies aviares, bien sea por transporte incontrolado de aves enfermas, o por migración de aves silvestres, y en la actualidad también ha sido detectado en Rusia, Turquía, Rumanía, Croacia, Ucrania y Grecia.

■ 4. Ecología viral

Las aves silvestres como reservorios del virus de la gripe

Las aves acuáticas y principalmente las pertenecientes al Orden Anseriformes (que incluye a los distintos tipos de patos, gansos y cisnes) son las principales hospedadores naturales de los virus de la gripe A. También se encuentran con frecuencia en limícolas, gaviotas, charranes y otras aves marinas. Albergan a todos los subtipos de virus conocidos y el medio acuático es determinante para la transmisión de la infección entre las aves silvestres. El virus lo contraen, principalmente, por ingestión del agua contaminada. A diferencia de los mamíferos, la infección afecta principalmente al tracto gastrointestinal en vez del respiratorio y, salvo raras excepciones, no se manifiestan signos clínicos evidentes. El virus se libera por las heces y es bastante resistente siendo el pH, la salinidad y la temperatura del agua los principales factores que condicionan su supervivencia en el medio acuático. La renovación del agua y la profundidad de los humedales son fac-



tores importantes para la transmisión del virus y también pueden determinar el tipo de aves que se infectan con mayor frecuencia. Todos estos factores, junto con la conducta migratoria de muchas de estas especies, contribuyen a que las aves acuáticas sean un reservorio de virus en la naturaleza a partir del cual se pueden infectar otras especies. Hay evidencias de infecciones directas desde aves acuáticas a cerdos, caballos, aves de corral y mamíferos acuáticos. Las aves silvestres, a su vez, pueden infectarse con virus que afectan a aves domésticas y transportarlo a lo largo de sus rutas migratorias. Un ave infectada puede eliminar virus a través de las heces durante un período variable que puede alcanzar los 30 días. Para que haya transmisión viral a larga distancia, las aves deben migrar durante este intervalo de tiempo. A lo largo de sus movimientos migratorios las aves pueden utilizar una o varias paradas en lugares separados entre cientos y miles de kilómetros, donde permanecen durante 7-10 días para acumular nuevas reservas para continuar el vuelo (Miller et al., 2005; Schaub and Jenni, 2001). Por lo tanto, la dispersión puede ser relativamente sencilla

para las cepas menos virulentas pero más difícil para cepas hipervirulentas que causan enfermedad grave o la muerte de los individuos afectados en pocos días.

No hay muchos estudios sobre la prevalencia de la infección virus de la gripe A en las aves silvestres pero un estudio serológico realizado recientemente en Europa, en el que se analizan 21.000 aves de 88 especies pertenecientes a 22 familias y 12 órdenes diferentes, refleja que el Orden más afectado es el de Anseriformes (15,2%) seguido por el de Charadriiformes (2,2%) y Paseriformes (2,9%). De las Anseriformes, el grupo más afectado es el de los patos, especialmente el Ánade Real con un 63,9% de animales seropositivos, es decir, que en algún momento han tenido contacto con alguno de los subtipos de virus de la gripe. En Doñana el 6,2% de las aves acuáticas (no anátidas) examinados habían estado en contacto con Influenza A (Astorga et al., 1996) con porcentajes que oscilaron entre el 0 y el 32%. En anátidas estas prevalencias variaron según la especie de de patos entre el 6,4% y el 9,9% (Astorga et al., 1994).

Entre las anseriformes se pueden presentar todos los subtipos conocidos de HA y de NA aunque predominan H6 y H3. En Charadriformes (limícolas y gaviotas) se han encontrado 10 tipos diferentes de HA y 8 de NA, aunque predominan los subtipos H9 y H13. En gansos de Doñana se han detectado cepas de los subtipos H2N2, H1N2 y H3N4 todas ellas de poca virulencia y que no afectan a humanos (León, 2004).

Los virus de la gripe se encuentran de forma estacional en las aves silvestres. En estudios sobre ándades reales se han encontrado a lo largo de todo el año, siendo especialmente frecuentes al final del verano, en los animales jóvenes que se disponen a realizar su primera migración. El número de aves infectadas disminuye en el otoño a medida que migran hacia sus zonas de invernada. En las aves limícolas, sin embargo, es más frecuente la infección en primavera y otoño mientras que en gaviotas y charranes es en verano y primavera. Es posible, por tanto, que los virus de la gripe se mantengan circulando durante todo el año por encadenamiento de infecciones en diferentes especies aviares.

Posibilidades para la dispersión de virus gripales por aves migratorias

En las aves silvestres infectadas no se observan signos de enfermedad ni lesiones evidentes con la mayoría de los virus de la gripe. Las cepas hipervirulentas se encuentran raramente en las aves silvestres aunque pueden producir en determinadas especies cuadros clínicos y tasas de mortalidad parecidos a los de las aves domésticas. El primer brote de infección mortal en aves silvestres se produjo en charranes en Sudáfrica en 1961 y lo causó un virus del subtipo H5N3. A lo largo de los años 2004 y 2005 se han producido diversos brotes de infección mortal en diversas especies acuáticas producidos por la misma cepa H5N1 que afecta a las aves domésticas. El foco inicial de gripe aviaria que afecta al sudeste asiático desde 2003 se ha extendido en dirección noroeste durante el verano de 2005 afectando primero a Rusia y Kazajstan y alcanzando después a Europa con brotes en Turquía, Rumania y Croacia durante el mes de octubre. El análisis genético de los virus H5N1 aislados en estos focos indica que derivan de los virus asiáticos. Otros brotes, sin embargo, se han producido espacial y tem-

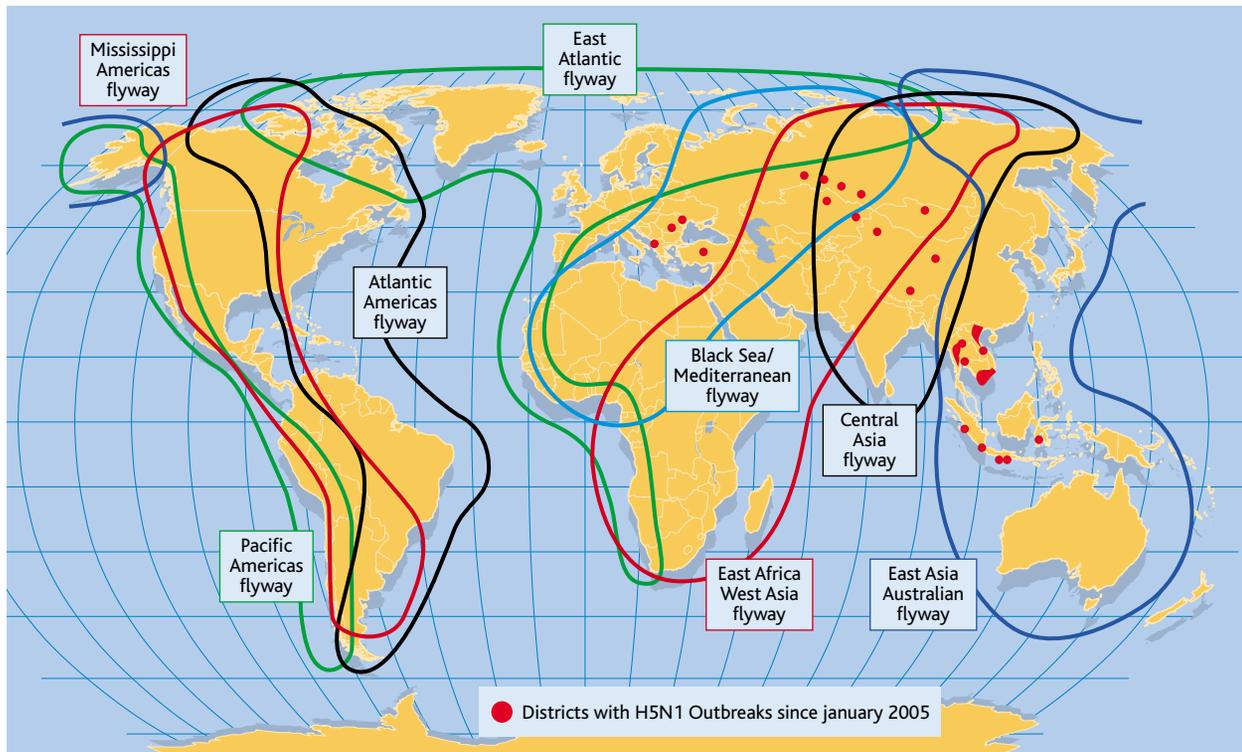


Figura 6. Principales rutas migratorias del mundo y localización geográfica de los brotes registrados del virus H5N1.

poralmente en zonas alejadas de los desplazamientos de las aves migratorias por lo que podrían achacarse a movimientos de aves de corral infectadas. Este patrón de dispersión propuesto para aves silvestres es sin embargo difícil de explicar

por las migraciones de las aves (Figura 6). En el caso de que las aves migratorias fueran el vector principal de dispersión del virus esperaríamos que el virus se expandiera de forma *principal* a lo largo de la ruta migratoria y *secundariamente* saltara a otras

vías migratorias cercanas. Sin embargo, el patrón de dispersión que ha seguido el virus es totalmente opuesto, siguiendo una dirección perpendicular a la de las rutas migratorias. Es también curioso que la dirección principal de dispersión haya sido en dirección noroeste, cuando las aves migratorias migran hacia el sur durante el periodo de dispersión. Todo esto hace que la información existente no aporte pruebas concluyentes sobre la importancia de las aves migratorias en comparación a otras vías de dispersión, principalmente comercio de aves. Es decir, se puede dar dispersión por transporte y comercio de aves de corral o por aves migratorias, pero en la actualidad desconocemos la importancia relativa de estas dos vías de transmisión.

La migración en Europa occidental sigue una dirección principal Norte-Sur y las zonas afectadas hasta el momento por la cepa H5N1 quedan fuera de las zonas más frecuentadas por las aves que migran a través de España (Figura 7). El riesgo, por tanto, de que se transmita la enfermedad por España y el resto de Europa occidental es relativamente bajo en estos momentos.

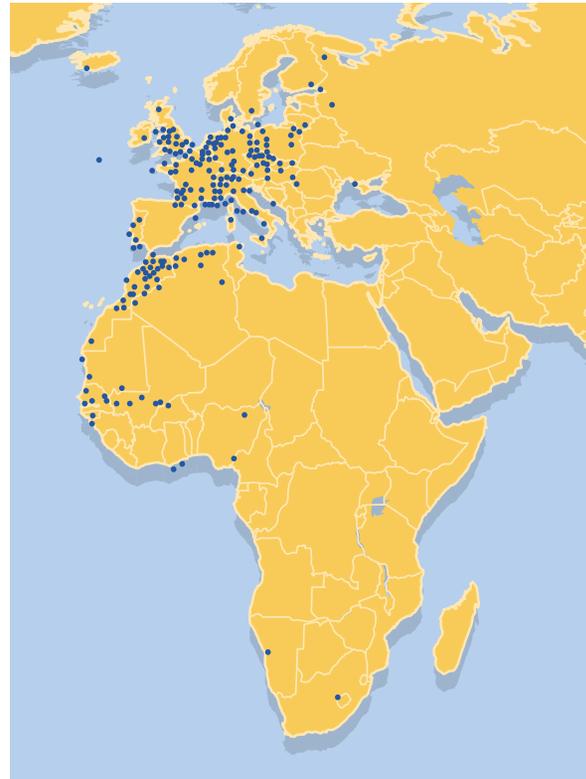


Figura 7. Localidades de recuperación de anillas ICONA en el extranjero durante 2002

Las aves infectadas se detectan mediante el aislamiento del virus, a partir de raspados cloacales o laringeos, en huevos embrionados de gallina. También se puede identificar a un ave portadora por amplificación de secuencias específicas del geno-

ma viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La presencia de anticuerpos específicos en el suero nos indica que el ave está o ha estado infectada por alguno de los subtipos virales. El control de los virus de la gripe en las aves silvestres es muy complicado debido al gran número de subtipos virales circulantes, a la alta frecuencia de intercambio genético que da lugar a nuevas cepas, a la gran diversidad de especies de aves susceptibles, a la gran variedad de hábitats que ocupan y a sus diferentes, complejos y a veces impredecibles comportamientos. Por este motivo, las medidas de prevención deben incluir el control de las aves silvestres, principalmente las acuáticas migratorias. En España se lleva a cabo un Plan de Vigilancia de Gripe en Aves para el muestreo sistemático de virus gripales en poblaciones representativas de aves silvestres y de corral, a cargo del Ministerio de Agricultura, en colaboración con el Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC). Además, es importante evitar el contacto directo entre las aves silvestres y las de corral, controlar el comercio de aves y mantener un control sanitario sistemático de las explotaciones avícolas.

■ 5. La gripe aviaria en las aves domésticas

La gripe aviaria como problema clásico de sanidad animal

La gripe aviaria o del pollo, es una enfermedad viral, altamente contagiosa, que afecta a una gran variedad de aves, tanto domésticas como silvestres, y que puede cursar desde una forma clínica leve, o incluso asintomática, hasta una forma aguda y mortal.

Atendiendo a la severidad de la enfermedad, se distinguen dos formas de gripe aviaria:

- **Gripe aviaria de alta virulencia** (HPAI, *Highly Pathogenic Avian Influenza*), que causa una enfermedad aguda con alta mortalidad.
- **Gripe aviaria de baja virulencia** (LPAI, *Low Pathogenic Avian Influenza*), que causa, en general, una enfermedad leve.

La forma aguda se describió por primera vez en Italia en 1878 como una enfermedad grave de las gallinas que se denominó Peste aviar, término actualmente en desuso. Desde 1959 se han descri-



to 25 brotes de gripe aviaria de alta virulencia en todo el mundo. De ellos, 12 los han producido cepas del subtipo H7 y 13 del H5. De los 25 brotes, 18 se han producido en pollos, 5 en pavos y 2 en varias especies de aves silvestres.

Aunque los subtipos H5 y H7 son predominantes en los brotes de gripe aviaria de alta virulencia, no todos los virus de esos subtipos son virulentos. Como se ha indicado anteriormente, la hemaglutinina de los virus causantes de los brotes de gripe aviaria de alta virulencia posee unas especiales características moleculares que la diferencian de la de los virus de baja virulencia. Otros factores genéticos también parecen estar involucrados en la patogenicidad de las cepas. Los virus de baja virulencia pueden mutar o combinarse con otras cepas y transformarse, tras circular durante cierto tiempo en una población de aves, en virus de alta virulencia. Por ejemplo, en Italia en los años 1999 y 2000, y en Holanda en 2003, se produjeron sendas epizootias de gripe aviaria de alta virulencia causadas por virus de los subtipos H7N1 y H7N7, respectivamente, que se originaron por

mutación de un virus de baja virulencia del mismo subtipo. Esta transformación se produjo a las pocas semanas de la introducción del virus de baja virulencia en las aves de corral.

Es difícil determinar el origen de una infección en una explotación avícola pero una parte de los brotes podrían comenzar con el contacto directo o indirecto con aves silvestres. La transmisión aérea es importante cuando la densidad de animales es alta. El virus se encuentra en grandes cantidades en las heces y en las secreciones nasales y orales de las aves infectadas y resiste activo largos periodos de tiempo. En otros casos el virus entraría en la explotación con la introducción de nuevos animales, utensilios o personas. Una vez introducido en una explotación, el virus se disemina a través del movimiento de las aves infectadas, del agua de bebida, del equipo y utensilios contaminados, del personal, etc. Se ha demostrado que el virus puede resistir hasta 8 días en heces de aves y 4 días en aguas contaminadas. Como se ha descrito antes, las aves silvestres también pueden transmitir los virus responsables a grandes dis-

tancias siguiendo sus rutas migratorias (Sturm-Ramirez et al., 2005).

El periodo de incubación de la HPAI es normalmente de 3 a 7 días, dependiendo del virus causante y de la especie y la edad del ave. Muchos animales aparecen muertos repentinamente sin signos premonitorios. El resto de los animales puede presentar depresión e inapetencia, plumas erizadas, diarrea, cresta y barbillas tumefactas y cianóticas, edema en la cabeza y alrededor de los ojos, excreción mucosa de los orificios nasales y de la cavidad oral, cese de puesta de huevos, áreas de hemorragia difusa en las patas y dificultad respiratoria. La muerte suele ocurrir dentro de las 48 h a partir de los primeros síntomas y puede afectar entre el 50 y el 100% de los animales (Fenner, 1999). En los casos de LPAI se observan, generalmente, dificultad respiratoria leve, depresión y reducción de la producción de huevos.

Prevención y control de la gripe aviaria

La HPAI es una enfermedad de declaración obligatoria y la Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E.) la

incluye en la "lista A" dado su carácter de enfermedad muy contagiosa y de gran importancia económica. La legislación europea relativa al control de la gripe aviaria se basa en las directivas 92/40/EEC y 92/66/EEC, según las cuales todo brote sospechoso debe ser investigado y, en el caso de confirmarse una gripe aviaria de alta virulencia, se deberán tomar las medidas apropiadas como son el sacrificio de las aves de las explotaciones infectadas y la cuarentena de la zona afectada. En la actualidad esta normativa está en proceso de revisión en función de la experiencia acumulada en los últimos años. Las drásticas medidas de control y erradicación de un brote de gripe aviaria pueden tener enormes consecuencias económicas y sociales. Por ejemplo, el brote de gripe aviaria acaecido en el norte de Italia entre 1999 y 2000, uno de los más graves registrados en Europa, obligó al sacrificio de más de 14 millones de aves de corral, lo cual produjo el colapso de la industria avícola del país durante varios meses y ocasionó pérdidas directas de más de 100 millones de euros. Las consecuencias económicas y sociales derivadas de la actual epizootía en Asia son incalculables y se mul-



Figura 8. Sacrificio masivo de animales en una granja afectada por gripe aviaria.

tiplican debido a la deficiente infraestructura sanitaria de los países afectados.

Las medidas profilácticas en las explotaciones aviares son de vital importancia para evitar la entrada y la diseminación de un brote de gripe aviaria. En áreas donde es frecuente la presencia de aves acuáticas, la explotación de aves de corral en régimen abierto es muy arriesgada. Es fundamental el control del tráfico de personas y de la entrada de nuevos animales. Son cruciales también las medidas higiénicas preventivas como la limpieza y la desinfección fre-

cuente de las instalaciones. En ausencia de medidas de control adecuadas, una epizootia de gripe aviaria puede durar años.

De acuerdo con la directiva europea 92/40/EEC se puede utilizar la vacunación frente a la gripe aviaria para suplementar las medidas de profilaxis recomendadas (Capua and Marangon, 2003). Las vacunas, fabricadas con virus inactivado, son eficaces en la prevención de la enfermedad y en la reducción de la mortalidad. A pesar de ello, la tasa de protección no es del 100% y tampoco se impide la eliminación de virus por las aves infectadas por lo que, a veces, puede ser contraproducente su uso. El principal problema de cualquier tipo de vacuna para controlar la gripe aviaria es la falta de reactividad cruzada entre unas cepas virales y otras. Por ello sería necesario formular una vacuna polivalente o, en su defecto, esperar a la identificación de la cepa causante del brote para proceder a la fabricación de la vacuna. La vacunación presenta, por otro lado, serios problemas de administración ya que ha de inyectarse a todas y cada una de las aves de una explotación. Por otro la-

do, la alta virulencia de algunos virus impide el uso de huevos embrionados para su fabricación ya que matan al embrión al poco tiempo de su inoculación. Para solventar este problema, en la actualidad se están desarrollando prototipos de vacunas frente al virus H5N1 en los que se ha reducido su virulencia mediante técnicas de genética inversa.

Carácter zoonótico de la gripe aviaria

Desde 1997 se han registrado infecciones en seres humanos a partir de virus aviares de alta virulencia de los subtipos H5N1, H7N7 y H9N2 que han producido enfermedad de gravedad variable incluida la muerte de algunos individuos afectados (WHO, 2005). Para llegar a infectarse, una persona debe tener un contacto directo con las aves afectadas o con sus excreciones por lo que, normalmente, se considera como una infección ocupacional que afecta al personal asociado con la industria avícola: granjeros, matarifes, veterinarios, etc. En la mayoría de los casos, la infección produce solo una conjuntivitis y no suele haber reacciones sistémicas. Sólo grandes epidemias de gripe aviaria de alta virulencia, como las que están

ocurriendo recientemente en Asia, con una masiva diseminación de virus al medio, aumenta las oportunidades de exposición de las personas y, consiguientemente, de infección. Por otro lado, también se incrementan las posibilidades de que virus humanos y aviares intercambien segmentos génicos. Esta situación puede ocurrir cuando las personas se infectan simultáneamente con ambos tipos de virus. Cuanto mas frecuentes sean las coinfecciones mayor será la probabilidad de que emerjan subtipos de virus completamente nuevos que posean las características genéticas suficientes que les permitan una transmisión eficiente de persona a persona.

La gripe en otros animales domésticos

Los virus de la gripe pueden infectar y producir enfermedad gripal en otros animales domésticos principalmente en cerdos y en caballos. Recientemente también se ha descrito la infección de perros a partir de virus de caballos (Crawford et al., 2005).

La gripe porcina se describió por vez primera al mismo tiempo que la pandemia de gripe de 1918 y

en la actualidad está extendida ampliamente por todo el mundo. Es una enfermedad respiratoria muy parecida a la gripe humana que esta producida por tres subtipos distintos de virus. Tiene una repercusión económica importante ya que produce un retraso en el crecimiento y, en ocasiones, abortos. La enfermedad gripal suele complicarse con infecciones secundarias con otros microorganismos. No es una enfermedad de declaración obligatoria y no existe una normativa específica para su control. Existen vacunas para la gripe porcina con una eficacia limitada aunque la vacunación no es frecuente en nuestro país. Los cerdos son susceptibles a la infección con virus aviares y humanos por lo que se les considera "cocteleras" en las que se pueden producir cepas nuevas de composición mixta capaces de infectar a los seres humanos (Wuethrich, 2003). Es aconsejable, por tanto, evitar el contacto directo de las aves silvestres acuáticas con las explotaciones porcinas.

■ 6. Detección e identificación de virus gripales. Sistemas de alerta

Descripción del cuadro clínico de la gripe aviaria en humanos

En la mayoría de los casos, la enfermedad humana parece iniciarse con un cuadro respiratorio agudo con fiebre (temperatura $\geq 38^{\circ}$ C), tos, dificultad respiratoria y malestar general, que evolucionan hacia un cuadro grave con "distress" respiratorio, que aparece después de una neumonía viral que presenta alteraciones radiológicas inespecíficas. Entre los casos de Vietnam y Tailandia de los que se tiene una descripción detallada del cuadro clínico (Tran et al., 2004), se ha observado una marcada linfopenia y es frecuente la aparición de un cuadro diarreico. Puede haber casos que presentan cuadros muy alejados de un síndrome gripal, lo que puede hacerlos irreconocibles (de Jong et al., 2005).

La letalidad entre los casos hospitalizados es alta, ocurriendo la muerte entre los 6 y los 29 días desde el inicio de los síntomas (mediana de 9 días).



Tabla 1

DEFINICIÓN DE CASO SOSPECHOSO

- Fiebre (>38°C) y síntomas respiratorios (tos o dificultad respiratoria)
- Cualquier otra enfermedad muy grave sin diagnóstico alternativo

ALGUNO DE LOS SIGUIENTES ANTECEDENTES EPIDEMIOLOGICOS

- Viaje a áreas afectadas y contacto con aves o cerdos
- Contacto cercano con posible caso
- Posible contagio por el tipo de trabajo desempeñado (accidente laboratorio y otros supuestos, como trabajo con aves sospechosas de estar infectadas)

DEFINICIÓN DE CASO CONFIRMADO

Persona en cuyo diagnóstico se han encontrado alguno de los siguientes resultados de laboratorio:

- PCR positiva para virus de la gripe AH5
- Cultivo positivo para virus de la gripe AH5 (solo se realiza en LBS 3)
- Detección por IF de antígenos del subtipo de virus gripal AH5
- Presencia de anticuerpos séricos específicos frente a gripe AH5 o su aumento significativo

La mayoría de los casos descritos han ocurrido entre 2 y 4 días tras la exposición, aunque recientemente se tiende a considerar períodos de incubación de más de 8 días.

Detección de la infección humana por gripe aviaria

Ante la aparición de un caso humano de gripe en el que se sospeche la infección por gripe A/H5N1, debe procederse inmediatamente al diagnóstico virológico del mismo, que se llevará a cabo en el laboratorio autonómico o en su defecto en el Centro Nacional de Microbiología (CNM). En cualquier caso el diagnóstico se verificará siempre en el CNM. En la Tabla 1 se recoge la definición de caso sospechoso y de caso confirmado. Las muestras más adecuadas para realizar el diagnóstico consisten en secreciones respiratorias y dos muestras de suero (tomadas en las fases aguda y convaleciente) http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/. En la Figura 9 se presenta un diagrama de la actuación y el flujo de información que debe ponerse en mar-



Figura 9. Esquema del proceso de identificación de un posible caso humano de gripe aviaria y de la transmisión de información que se genere. Con triángulos se indican los laboratorios localizados en las CCAA, que forman la Red de Laboratorios Españoles de Gripe.

cha ante la detección de cualquier caso sospechoso o confirmado de gripe aviaria.

Diagnóstico

La identificación y caracterización de los virus del tipo aviar AH5N1 se lleva a cabo esencialmente de la misma manera que la de los virus gripales que producen los brotes anuales habitua-

les en cada invierno, aunque existen algunos criterios a tener en cuenta para poder asegurar los niveles de bioseguridad imprescindibles al trabajar con virus de potencial pandémico. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado una serie de "guías" para la toma de muestras y el procesamiento de las mismas o de productos que puedan contener virus A H5N1 infeccioso

(http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/ ;
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/;
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/transport/en/)

Los ensayos que habitualmente se utilizan consisten en la detección del virus, sus antígenos o sus genes (métodos directos) o bien de la presencia o del aumento significativo de los niveles de anticuerpos específicos (método indirecto).

El aislamiento del virus se realiza inoculando las muestras clínicas en cultivos celulares o en huevos de gallina embrionados. Su crecimiento en estos substratos (Figura 10) se puede demostrar por IF con anticuerpos monoclonales o bien por la capacidad hemaglutinante de los fluidos del embrión o de los sobrenadantes de los cultivos. En el caso de sospecha de gripe aviaria, el cultivo ha de llevarse a cabo en un laboratorio de nivel de bioseguridad 3 (BSL 3) para evitar la infección del personal de laboratorio y la diseminación del virus a la comunidad.

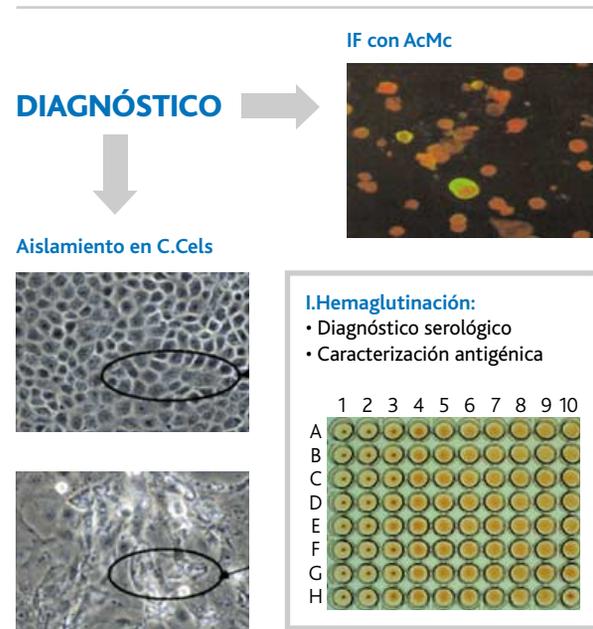


Figura 10. Esquema del proceso de aislamiento y caracterización de un aislado viral.

Los antígenos del virus AH5N1 pueden detectarse también por una serie de técnicas inmunológicas que incluyen la inmunofluorescencia (IF) o el enzoinmunoanálisis (EIA) en las secreciones respiratorias, mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Zambon, 1998). En los últimos años se han comercializado pruebas rápi-

das, en muchos casos basadas en ELISAS en membrana, cuya sensibilidad y especificidad presenta un amplio rango de variación. Pueden detectar los virus del tipo A, aunque sin diferenciar el subtipo, por lo que su aplicación fundamental sería el "cribado" de las muestras, para dirigir el diagnóstico específico a los casos más importantes.

Entre los ensayos para la detección de genes virales, los de mayor aplicación son los basados en amplificación por RT-PCR. La amplificación de los genes de proteínas estructurales internas suele ser la base para la identificación del género Virus Influenza tipo A (Coiras et al., 2003). Se combinan con los ensayos específicos para la detección de los distintos tipos de HA y NA, cuyos iniciadores o *primers* se diseñan en estos genes. En el caso de los virus AH5N1 se utilizan todas las modalidades de RT-PCR, como PCR anidadas, sencillas o múltiples, a tiempo real, seguidas de hibridación o formando parte de *microarrays*. La sensibilidad de muchos de estos ensayos puede superar la del cultivo del virus. Los

laboratorios especializados en vigilancia de gripe, como el CNM en España, han ido desarrollando sus propios ensayos de PCR para diagnosticar AH5N1. En este momento empiezan a aparecer también kits comerciales, que serán de gran ayuda para muchos laboratorios pequeños. El análisis por PCR no requiere el uso de un laboratorio de alta seguridad (BSL 3), ya que los métodos de extracción de ácidos nucleicos suelen destruir la infectividad del virus.

Entre los métodos descritos, los de análisis genómico y el cultivo del virus son los más utilizadas gracias a su versatilidad, ya que permiten detectar virus muy heterogéneos. Esto tiene gran importancia en el caso de las infecciones gripales, cuyo cuadro clínico comparte síntomas y signos con los producidos por diferentes virus respiratorios como adenovirus, parainfluenza y otros (Coiras et al., 2004; Templeton et al., 2004). Estos dos tipos de ensayos presentan también la ventaja de constituir el primer nivel en el proceso de caracterización del virus. Para la caracterización antigénica es imprescindible realizar el aislamiento del virus,

La gripe aviaria ¿una nueva amenaza pandémica?

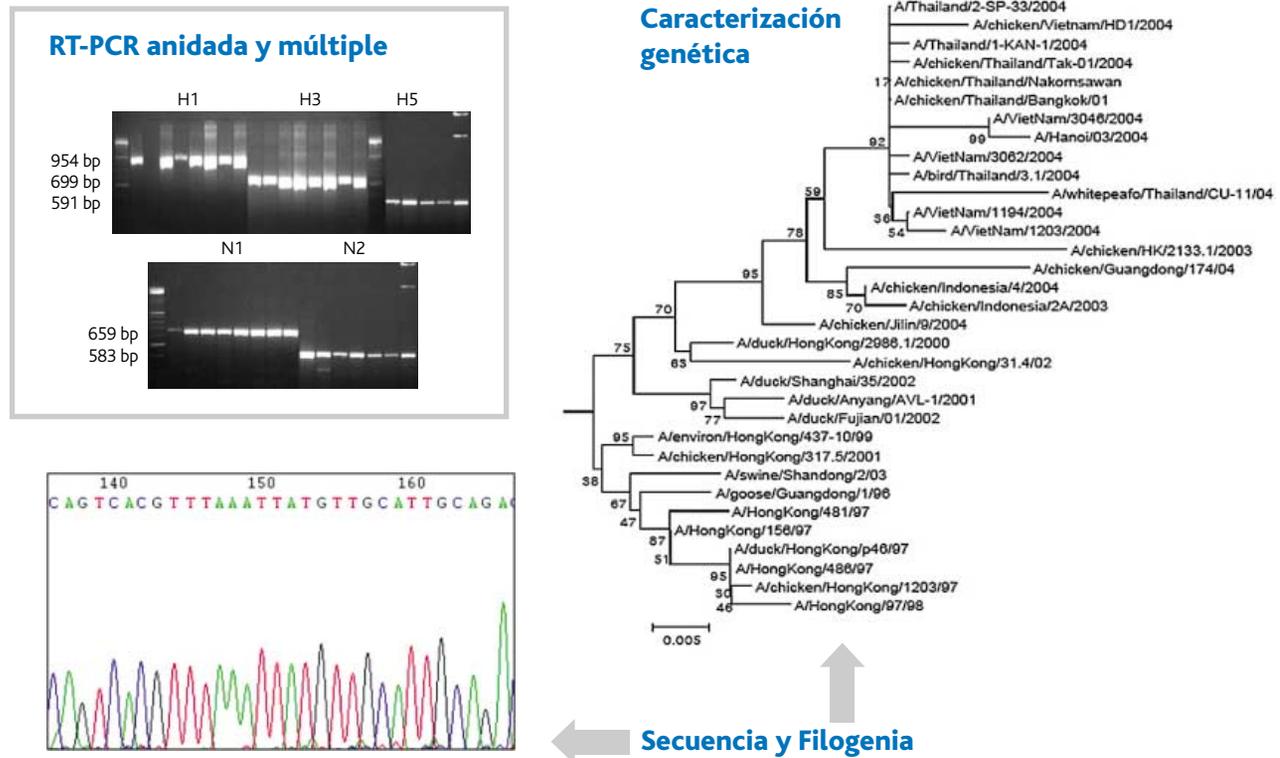


Figura 11. Esquema del proceso de caracterización de la secuencia y filogenia de un aislado viral.

pero la caracterización genética puede llevarse a cabo a partir de la amplificación de los genes de la HA y NA (Figura 11).

Los ensayos serológicos sirven para determinar de manera indirecta si se ha producido infección por

el virus mediante la medida de anticuerpos específicos. En el momento actual, la existencia de anticuerpos frente a gripe AH5 podría considerarse indicativa de la infección reciente por este de virus, puesto que este subtipo no ha estado circulando en nuestro entorno. En todo caso, se recomienda



la toma de dos muestras de suero correspondientes a las fases aguda y convalescente de la enfermedad, a fin de poder comprobar la aparición de los anticuerpos o su refuerzo significativo. Para el diagnóstico de AH5 en el momento actual, la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IH) es una buena elección por su especificidad. Se basa en la inhibición de una propiedad de los virus gripales, que es la de aglutinar hematíes de animales de distintas especies. La HA de todos los virus gripales se une a los receptores de los eritrocitos formando una especie de red y evitando la sedimentación de los mismos, lo que impide la formación de un precipitado en forma de botón rojo, muy visible. Cuando una cantidad determinada de virus se mezcla con diluciones de suero que posee anticuerpos frente a H5, estos neutralizan al virus e inhiben su capacidad hemaglutinante, apareciendo el botón rojo por la sedimentación de los hematíes.

Caracterización de los virus

Se lleva a cabo atendiendo a dos aspectos del virus (antigénico y genético) relacionados entre sí, aunque no totalmente equivalentes. El genotipo se

Hemaglutinina H5

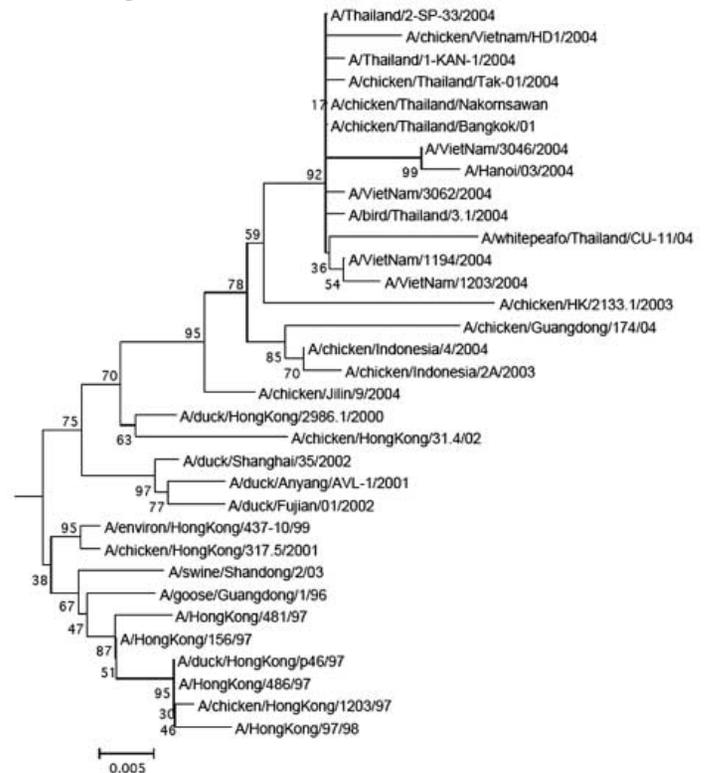


Figura 12. Análisis filogenético de los virus H5N1 mediante caracterización de las secuencias de los genes de la hemaglutinina.

realiza mediante la secuenciación de la HA y la NA, seguida de su análisis filogenético (Figura 12). El análisis fenotípico o antigénico se realiza mediante inhibición de la hemaglutinación cruzada, entre

un repertorio de virus más o menos cercanos entre sí y sus antisueros correspondientes, obtenidos inoculando hurones, que son animales que padecen una infección semejante a la humana. Aunque no hay una correlación absoluta entre los perfiles de inhibición de la hemaglutinación de las cepas variantes dentro de un determinado subtipo y el árbol filogenético originado al comparar sus secuencias, se observa una tendencia parecida en la evolución de los mismos. El análisis antigénico se ha mantenido sin grandes modificaciones desde su inicio en los años 50, hasta hace unos dos años en que la aplicación de moderna metodología estadística ha permitido una cuantificación fiable de los resultados de los ensayos. Se ha podido comprobar que la evolución genética avanza de forma gradual mientras la antigénica lo hace de forma discontinua (Smith et al., 2004) ya que no siempre los cambios genéticos tienen una repercusión semejante en la capacidad antigénica de las proteínas.

En el caso del análisis de los virus H5N1 actuales, la disponibilidad de las amplias bases de datos de secuencias de virus gripales, ha facilitado su com-

paración con virus H5 aislados de aves a lo largo de un período de 50 años. Los estudios filogenéticos realizados han permitido situar al virus entre sus ancestros, en el linaje euroasiático e identificar mutaciones relacionadas con su virulencia y su posible transmisibilidad (Iwatsuki-Horimoto et al., 2004; Li et al., 2004), ayudando a comprender el brote y sus posibles consecuencias.

Red para la vigilancia de la gripe en España

En 1992 comenzó a funcionar en España un sistema específico para la vigilancia de la gripe que está formado por un conjunto de redes autonómicas. En cada CCAA se ha organizado a tal fin una red de médicos centinelas, coordinada por el Servicio de Epidemiología correspondiente, y un Laboratorio de Virología. La red nacional está coordinada por el Instituto de Salud Carlos III (Centro Nacional de Microbiología, CNM, en su vertiente virológica y por el Centro Nacional de Epidemiología, CNE, en la epidemiológica y clínica).

El funcionamiento del sistema se basa en la identificación de casos de gripe por los médicos cen-

tinelas que realizan la toma de muestras de los pacientes y las envían a los laboratorios para ser analizadas. Se ha diseñado un protocolo de trabajo que recoge tanto los aspectos clínicos y epidemiológicos, definiciones, criterios y fichas, como los virológicos, técnicas de identificación de los virus, caracterización de los mismos desde el punto de vista genético y antigénico y criterios para su clasificación.

Los dos aspectos deben ser capaces de proporcionar semanalmente una serie determinada de datos que se analizan conjuntamente y suministran información al sistema sanitario español, al europeo (EISS) y a la OMS. Parte de esta información está disponible para la consulta pública en <http://cne.isciii.es/htdocs/ve/ve.htm>.

Actualmente la vigilancia y el diagnóstico de la gripe aviaria H5N1, se ha asumido por esta red de vigilancia nacional. Existe una pag web del Ministerio de Sanidad y Consumo dedicada a ello: http://www.msc.es/Diseno/enfermedadesLesiones/enfermedades_transmisibles.htm. Además se

han determinado las actuaciones y el sistema de flujo de información que se pone en marcha ante la aparición de cualquier caso sospechoso de ser una infección humana por el virus aviar según se observa en el diagrama de la Figura 9.

En el nivel europeo, en 1993, 6 países, entre ellos España, iniciaron una red para la vigilancia de gripe que se llamó *European Influenza Surveillance Scheme* (EISS). Este sistema se ha desarrollado abarcando a la mayoría de los países europeos y ha alcanzado un alto nivel en sus procedimientos (Meijer et al., 2005). Por otra parte tres laboratorios españoles participan en el sistema mundial de vigilancia de gripe de la OMS, en el que se integran más de 100 laboratorios. Existe por tanto una estrecha relación entre los laboratorios españoles e internacionales lo que permite compartir experiencia e información acerca de lo que ocurre en cualquier país de forma inmediata.

Preparación ante una posible pandemia

En los finales del siglo XX se detectaron en varias ocasiones infecciones humanas por virus aviares,

Tabla 2

ESQUEMA DE LAS FASES A CONSIDERAR EN UNA PANDEMIA GRIPAL

Período Interpandémico

- Fase 1:** No se han detectado nuevos subtipos del virus de la gripe en personas. Los virus que circulan en animales se consideran de riesgo bajo para el hombre
- Fase 2:** No se han detectado nuevos subtipos gripales en personas, pero en animales circula un subtipo que representa un riesgo para el hombre

Período de Alerta Pandémica

- Fase 3:** Infección humana por nuevo subtipo. No transmisión persona-persona
- Fase 4:** Agrupaciones de pocos casos con limitada transmisión persona-persona
- Fase 5:** Agrupaciones mayores de casos. Transmisión persona a persona sigue siendo localizada (sugiere que virus está aumentando su adaptación al hombre)

Período Pandémico

- Fase 6:** Pandemia. Transmisión elevada y sostenida entre la población general.

Período Post-Pandémico

Vuelta al periodo interpandémico.

algunas tan alarmantes como la producida en Hong Kong en 1997. Teniendo en cuenta que la última pandemia se había producido hacía unos 30 años, era lógico pensar que pudiéramos estar acercándonos a una próxima pandemia y que era necesario prepararse frente a ella. En el panorama actual de la aldea global, el riesgo en relación

con pandemias anteriores podría estar aumentando y los acontecimientos producirse con mayor rapidez. En 1999 la OMS recomendó a los países poner a punto planes estratégicos de emergencia, a fin de paliar el devastador impacto que una pandemia puede ejercer en la humanidad. Para ello se requiere un alto grado de previsión y organi-

La gripe aviaria ¿una nueva amenaza pandémica?

zación, tanto a nivel nacional como supranacional, en la Unión Europea, y finalmente en el nivel mundial. La guía de actuaciones elaborada por la OMS, basada en los datos de pandemias anteriores, ha servido para el diseño de los planes pandémicos. En un primer apartado de la misma se definen 6 fases predecibles agrupadas en tres períodos que diferencian la actividad gripal habitual y la pandémica (Tabla 2). La OMS se reserva el derecho a definir la fase en que nos encontraríamos en cada momento.

El plan pandémico español (Plan Nacional de Preparación y Respuesta ante una Pandemia de Gripe), que se encuentra en la web del Ministerio de Sanidad, http://www.msc.es/Diseno/enfermedadesLesiones/enfermedades_transmisibles.htm recoge estas indicaciones y destaca una serie de puntos fundamentales: a) La Vigilancia gripal, en el ámbito humano y animal; b) La toma de medidas de control, que incluye posibles vacunas, antivirales, antibióticos y otros recursos; c) El flujo de comunicación entre los estamentos implicados, así como la organización de la información

en todos los niveles, incluido el de la población general; d) El marco legal, imprescindible para actuar en situaciones excepcionales. Por otra parte se desarrollan una serie de órganos, como el Comité Ejecutivo, con capacidad para tomar las decisiones y varios Subcomités que atienden los diversos aspectos a considerar en la preparación pandémica. Las CCAA preparan a su vez sus planes parciales, de forma que las acciones en los niveles autonómico y nacional estén armonizadas para alcanzar la máxima eficacia.

La Unión Europea ha elaborado su propio plan para coordinar las actuaciones de los países miembros, programar objetivos comunes, establecer las normas de información y comunicación y otros compromisos.



■ 7. Prevención y Terapia

Vías de contagio

Los virus de la gripe se transmiten de persona a persona a través de las secreciones respiratorias. Normalmente las partículas virales van en pequeñas gotas que se expulsan al toser o que se producen como consecuencia de secreciones nasales. El virus también se puede transmitir por contacto directo o indirecto con superficies contaminadas con el virus. Por ello durante el manejo de pacientes infectados con el virus gripal se deben seguir las normas básicas de higiene que incluyen el lavado de las manos y el uso de guantes.

En una situación pandémica, la OMS recomienda además que cualquier personal que entren en contacto directo con los enfermos use mascarillas de protección respiratoria (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/pharmaintervention2005_11_3/en/index.html). En la actualidad esta medida está recomendada únicamente para aquel personal que entre en contacto con

aves infectadas o muertas por el virus H5N1 (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/en/Avian%20Influenza.pdf)

Reacción inmune

Como frente a cualquier otra infección, el sistema inmune reacciona frente a una infección gripal produciendo una respuesta humoral, que implica la producción de anticuerpos, y una respuesta celular que conlleva a la producción de células citotóxicas (CD8+) con capacidad de lisar células que estén infectadas (revisado en (Cox et al., 2004). Se producen anticuerpos mayoritariamente frente a cuatro antígenos virales (las proteínas NP, M1, HA y NA), si bien los únicos protectores son los dirigidos contra la HA y NA. Mientras que los anticuerpos anti-HA son neutralizantes y por tanto previenen la infección, el principal efecto de los anticuerpos anti-NA es reducir la liberación del virus de la célula infectada. La respuesta de anticuerpos implica tanto la producción de IgA que se secretan en las mucosas de las vías respiratorias como la producción de una respuesta sistémica con predominio de las inmunoglobulinas IgG e IgM.

La respuesta citotóxica está dirigida principalmente contra las proteínas M y NP, y aunque este tipo de respuesta no es protectora si contribuye a eliminar el virus y a la recuperación de la infección.

Vacunas inactivadas y atenuadas

En la actualidad en España hay autorizados un total de 14 vacunas antigripales para uso en humanos. En todos los casos se trata de vacunas inactivadas que contienen virus que se ha crecido en huevos de gallina embrionados. Las vacunas son trivalentes pues contienen tres cepas virales, dos del tipo A (una cepa H1N1, y otra cepa H3N2) y una cepa del tipo B que corresponden a los virus que circulan en humanos en la actualidad. Desde el punto de vista regulatorio el único requerimiento de potencia es que cada dosis de vacuna debe contener al menos 15 microgramos de la HA de cada una de las tres cepas.

Una peculiaridad de las vacunas antigripales que las distingue del resto de vacunas humanas es que su composición se revisa anualmente, como

Procedimiento para actualizar la composición de la vacuna antigripal

FEBRERO. Reunión de la OMS en la que tras evaluar la situación epidemiológica a nivel mundial y las características antigénicas e inmunogénicas de las cepas circulantes, se realiza una recomendación de los antígenos HA NA que deben estar presentes en la vacuna.

Se preparan virus reassortants que contienen los genes que codifican la HA y NA de las cepas recomendadas por la OMS y el resto de los genes de la cepa A/Puerto Rico/8/34.

Las compañías fabricantes de vacuna realizan ensayos de producción piloto con los reassortants obtenidos.

ABRIL-MAYO. Tras considerar los resultados de los ensayos piloto, y la situación epidemiológica europea, la EMEA indica las cepas que se deben incluir en la vacuna antigripal para Europa para esa temporada.

SEPTIEMBRE. La vacuna está disponible en las farmacias.

Figura 13. Esquema de la actualización anual de la vacuna antigripal.

consecuencia de que las propiedades antigénicas de la HA y NA de las cepas que circulan en la población humana cambian gradualmente (deriva antigénica). El procedimiento que se sigue anualmente para actualizar la composición de la vacuna antigripal se esquematiza en la Figura 13, y como se ve es un proceso muy ajustado en el tiempo pues sólo transcurren 7 meses desde que la OMS toma la decisión sobre las cepas que tienen que incluirse en la vacuna y el momento en que las vacunas están en las farmacias.

Las vacunas antigripales inactivadas que se comercializan en la actualidad son de dos tipos: de virus roto y de antígenos purificados. En ambos casos, el proceso de producción implica la inactivación del virus crecido en embriones, generalmente por tratamiento con formalina o beta-propiolactona. Posteriormente el virus se concentra y se lisa en presencia de un detergente para obtener las vacunas de virus roto. Si adicionalmente se realiza una etapa posterior de purificación que enriquece en los antígenos HA y NA se obtiene la vacuna de antígenos de superficie. La mayoría de

las vacunas antigripales no tienen ningún adyuvante (compuesto que potencia la respuesta inmune frente al antígeno viral presente en la vacuna), y de tenerlo el único autorizado en la actualidad es el compuesto MF-59. Las vacunas que incluyen este adyuvante inducen una mayor respuesta inmune en el vacunado pero como contrapartida producen un mayor número de reacciones adversas.

La eficacia de las vacunas antigripales está determinada principalmente por dos factores: la edad del vacunado y el grado de similitud antigénica entre la cepa presente en la vacuna y la cepa que infecte al huésped. La eficacia es menor en los mayores de 65 años pues la respuesta inmune que induce la vacuna es menor en personas de este grupo de edad. Por otro lado, para cualquier grupo de edad la eficacia de la vacuna aumenta cuanto mayor es la similitud antigénica entre la cepa que infecta y la cepa incluida en la vacuna. Las vacunas inducen altos títulos de anticuerpos frente a la HA, y previene la infección en un 70-90% de los adultos menores

de 65 años. Estos porcentajes se reducen en la población de mayores de 65 años, aunque en este grupo de edad reduce las hospitalizaciones y la mortalidad asociados a la infección con virus de la gripe. En España la vacuna antigripal está recomendada en personas mayores de 60-65 años (según CCAA) y en personas de cualquier edad que tengan una patología de base (por ejemplo enfermedades crónicas cardiovasculares o respiratorias) que se pueda agravar como consecuencia de la infección gripal.

En EEUU desde el año 2003 se comercializa una vacuna antigripal trivalente de virus vivos atenuados. La vacuna que se administra nasalmente contiene tres virus recombinantes que contienen la HA y la NA de las cepas recomendadas por la OMS para esa temporada año y el resto de los segmentos de RNA de dos cepas paternas (una de tipo A y otra de tipo B) que confieren las propiedades atenuadas a las cepas presentes en la vacuna. De momento estas vacunas solo están indicadas para adultos sanos de entre 5 y 50 años de edad. Todos los aspectos comentados en este apartado

han sido revisados recientemente (Prevention and Control of Influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Morbidity and Mortality Weekly Report. 2005 / Vol. 54 / No. RR-8).

Vacunas pandémicas

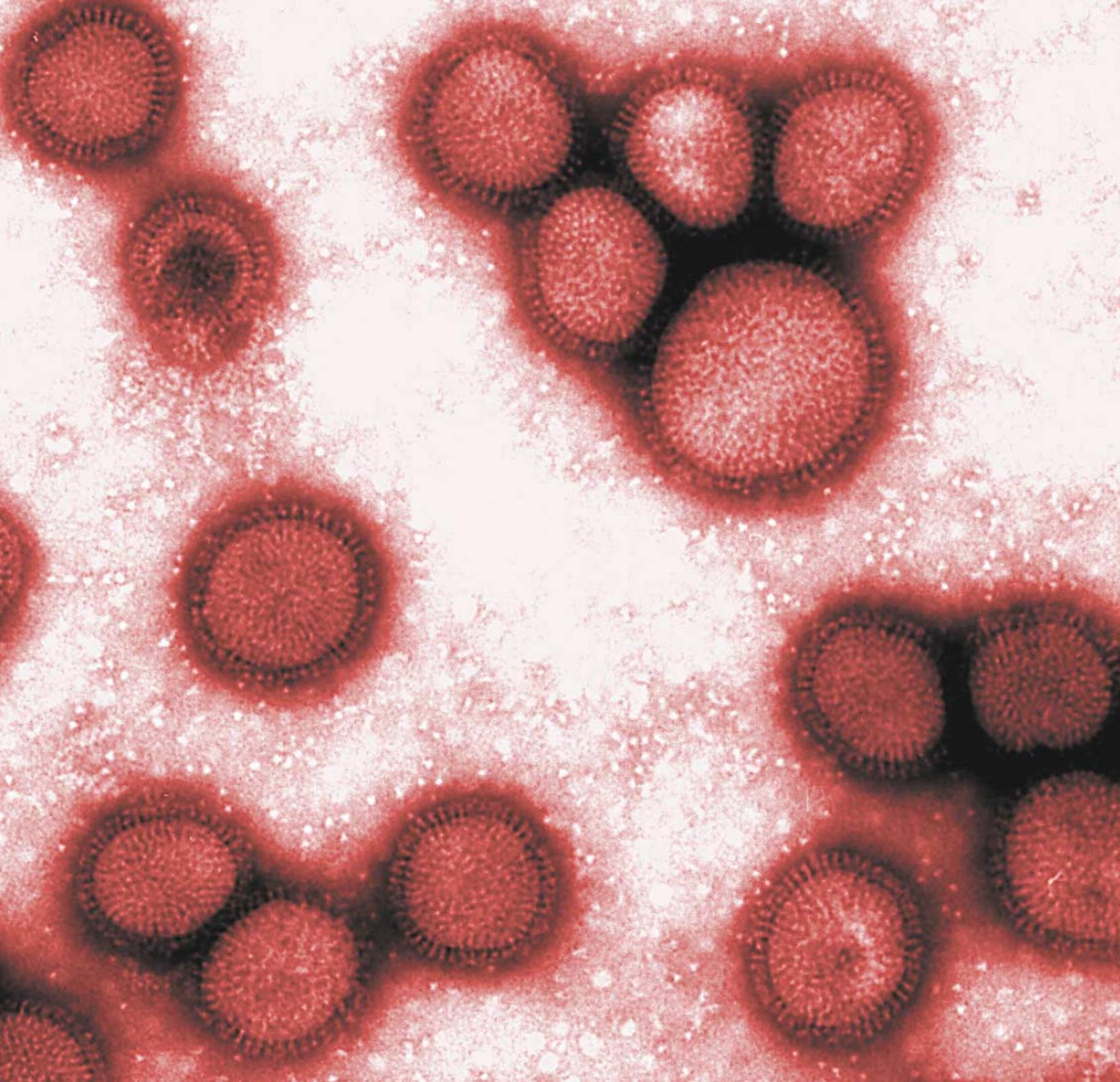
Normalmente la autorización de comercialización de un medicamento es un proceso que implica varios años de desarrollo por parte del laboratorio fabricante y un proceso de evaluación de casi un año por la agencia evaluadora (Nacional o Europea) que finalmente autoriza el medicamento. Es obvio que esta escala de tiempos no permitiría disponer de una vacuna para hacer frente a una pandemia que se extendiera por todo el mundo en un plazo de meses. Consciente de esta situación la EMEA, como agencia que autoriza medicamentos a nivel europeo, ha desarrollado un procedimiento de registro especial (<http://www.emea.eu.int>). Este procedimiento tiene además en cuenta dos peculiaridades que chocan con la propia definición de vacuna (y de medicamento) y es que para que exista una va-

cuna tiene que haber un agente infeccioso conocido que produzca la enfermedad y que además se hayan realizado ensayos clínicos que demuestren que la vacuna es eficaz en prevenir la enfermedad. A fecha de hoy no hay virus pandémico, y por ello no se conoce que virus debe incluirse en la vacuna, y como es obvio al no haber vacuna no hay ensayos clínicos que demuestren que es eficaz. En las directrices desarrolladas por la EMEA se indica que el laboratorio solicitante debe presentar un expediente base ("core" dossier) que describa todo el proceso de producción y que incluya la preparación de lotes de vacuna utilizando una cepa de virus de la gripe tipo A que no sea de los subtipos H1 ni H3 que son los componentes de las vacunas interpandémicas anuales. El expediente debe incluir datos toxicológicos y de inmunogenicidad de la vacuna. Este expediente base lo evaluará la EMEA siguiendo el procedimiento habitual para cualquier vacuna y si cumple los requisitos adecuados de calidad, seguridad y eficacia se autorizará como un registro de vacuna antigripal pandémica. En una situación futura, cuando la OMS

declare una pandemia, será este organismo el que indique cual será la cepa que debe incluirse en la vacuna. Los laboratorios fabricantes utilizarán dicha cepa para producir la vacuna conforme al expediente base autorizado, y únicamente tendrán que presentar una solicitud de variación de dicho expediente que recoja los cambios pertinentes debidos a la utilización de la cepa recomendada por la OMS. Se prevé que la EMEA evalúe esta documentación adicional en el plazo de unos pocos días de manera que si se cumplen los requisitos adecuados se autorice rápidamente dicha vacuna pandémica.

Vías alternativas de vacunación

Existen en fase de desarrollo otras alternativas a las vacunas antigripales mencionadas en el apartado "vacunas inactivadas y atenuadas". Entre ellas cabe destacar la utilización de vacunas recombinantes basadas en virus vacunales que expresen la HA y la NA viral, el uso de proteína HA expresada en células de insecto y vacunas de DNA que codifica antígenos virales. Los resultados obtenidos en animales de experimentación son pro-



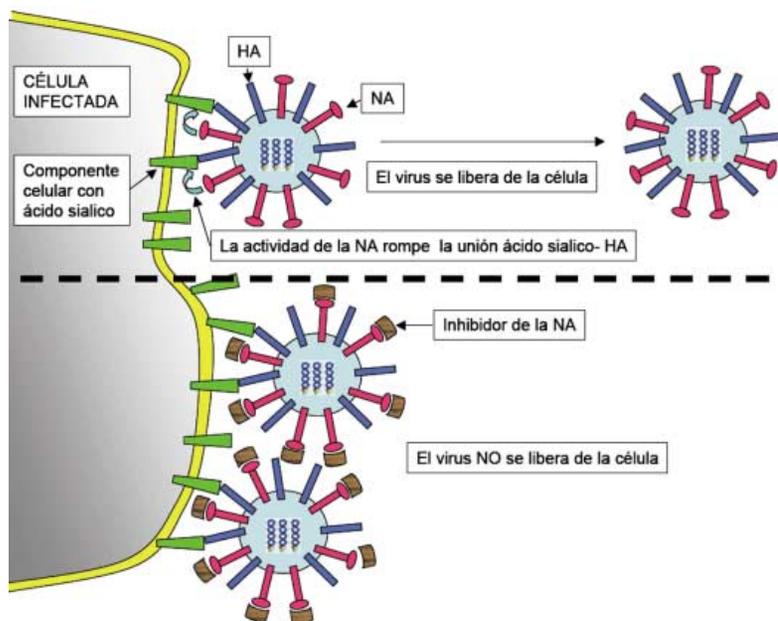


Figura 14. Actividad de los inhibidores de la NA. En la situación natural en ausencia de inhibidor (parte superior) el virus sale de la célula infectada y queda retenido en la superficie de la misma por interacciones de la HA con componentes celulares que contienen ácido siálico. La NA actúa sobre estas uniones rompiendo el ácido siálico y permitiendo así que el virus se libere y pueda infectar una nueva célula. En presencia del inhibidor de la NA (parte inferior), la actividad de la NA está inhibida y por ello el virus recién producido no puede liberarse de la célula y por tanto no inicia una nueva infección.

metedores aunque las vacunas deben caracterizarse en mayor detalle antes de puedan registrarse como vacunas para uso en humanos.

Antivirales

Son medicamentos que a diferencia de las vacunas no van a inducir respuesta inmune protectora frente a la infección. Se trata de compuestos químicos con capacidad de neutralizar alguna función del virus y de esta manera reducir la capacidad del

virus de reproducirse en el huésped. Los antivirales se pueden usar de manera profiláctica (antes de estar infectado) para prevenir o minimizar la infección, o de manera terapéutica para tratar una infección ya existente.

Actualmente existen a nivel mundial sólo cuatro antivirales autorizados como medicamentos: dos conocidos como adamantanos (la amantadina y la rimantidina) y dos conocidos como inhibidores

de la NA (el zanamivir y el oseltamivir). Exceptuando la rimantidina, los otros tres antivirales están autorizados en España. Este hecho no supone que exista una laguna terapéutica, pues la actividad de ambos adamantanos es similar y de hecho la rimantidina no está autorizada en muchos otros países del mundo.

Los adamantanos se unen a la proteína M2 inhibiendo su actividad de canal iónico, y de esta manera bloquean una etapa temprana de la infección viral (véase apartado 1) Los inhibidores de la NA actúan en la fase tardía de la infección inhibiendo la actividad enzimática de la NA que va a evitar que los viriones formados se agreguen y queden asociados a la membrana de la célula de la que han salido (Figura 14).

Los tres antivirales autorizados en España difieren en muchas propiedades, algunas de las cuales se resumen en la Tabla 1 (Moscona, 2005). Como puede verse en la Tabla en lo que respecta a efectos adversos, el peor perfil corresponde a los adamantanos que producen comúnmente alteracio-

nes gastrointestinales y del sistema nervioso central. Los inhibidores de la NA tienen un buen perfil de seguridad causando efectos adversos leves y sólo muy raramente se han descrito procesos de broncoespasmo en pacientes con asma. Los adamantanos llevan usándose más de 30 años, mientras que los inhibidores de la NA son medicamentos recientes y llevan menos de cinco años autorizados en Europa. Por ello hay una mayor información sobre los inhibidores de la proteína M2 que sobre los inhibidores de la proteína NA. El zanamivir y el oseltamivir son eficaces tanto frente a virus de tipo A y B, mientras que la rimantidina y la amantadina únicamente actúan sobre virus de tipo A.

Los estudios realizados hasta la fecha en condiciones interpandémicas indican que los cuatro antivirales cuando se usan en tratamiento terapéutico tienen un efecto modesto, pues únicamente reducen en un solo día los síntomas de la enfermedad gripal y este efecto sólo tienen lugar cuando el antiviral se administran antes de las 48 horas desde el inicio de enfermedad.

Antiviral	Amantadina	Oseltamivir	Zanamivir
Efectos adversos más habituales (% de personas que sufren los efectos)	Comunes (5-10%): Efectos gastrointestinales y sobre el sistema nervioso central	Comunes (5-10%): Nausea, vómitos, y dolores de cabeza	Muy raros: broncoespasmo en pacientes con asma
Uso en niños	No recomendado	No recomendado en niños de menos de 1 año de edad	No apropiado para niños menores de 5 años
Formulaciones/periodo de validez	Tabletas /5años	<ul style="list-style-type: none"> • Cápsulas/ 5 años • Polvo para suspensión oral/ 5 años • Fórmula magistral para preparar solución oral/ 10 años 	Polvo para inhalación/ 5 años
Forma de administración)	Oral	Oral	Inhalación usando un dispositivo especial que se proporciona con el medicamento
Indicaciones autorizadas	Tratamiento de la enfermedad y profilaxis	Tratamiento de la enfermedad y profilaxis	Tratamiento de la enfermedad

Tabla 3. Propiedades e indicaciones de los antivirales específicos para virus de la gripe

En relación con el uso profiláctico, estudios clínicos con amantadina y rimantidina indican que su eficacia oscila entre un 70 y un 90%. Entre los inhibidores de la NA sólo está autorizado el oseltamivir para profilaxis. No obstante, existen es-

tudios con ambos inhibidores de NA que demuestran que los dos fármacos poseen una eficacia profiláctica similar (entre 67 y 84%) y similar a la alcanzada por los inhibidores de la proteína M2 (<http://www.emea.eu.int>).

Aparición de virus resistentes, mecanismos de resistencia y patogenicidad de virus resistentes

Los virus, como todos los seres vivos, cuando se multiplican producen algunas partículas virales que llevan alteraciones en su genoma. En la mayoría de los casos estos cambios reducen la eficacia del virus para completar un nuevo ciclo viral. En otros casos, sin embargo, pueden dar una ventaja selectiva al virus. Este sería el caso si la mutación convierte al virus en resistente al antiviral y le permite completar su ciclo infectivo aún en presencia del mismo. Dado que la efectividad de un tratamiento antiviral está en gran medida determinada por la aparición de virus mutantes resistentes al fármaco, éste es un aspecto especialmente relevante cuando se habla de antivirales. Se ha descrito repetidamente la aparición de virus resistentes a los adamantanos cuando estos compuestos se han usado en terapia. Los virus resistentes aparecen muy rápido, incluso tras dos días de iniciarse el tratamiento, y pueden aislarse de hasta en un tercio de los pacientes tratados. Los virus resistentes tienen la misma virulencia y se

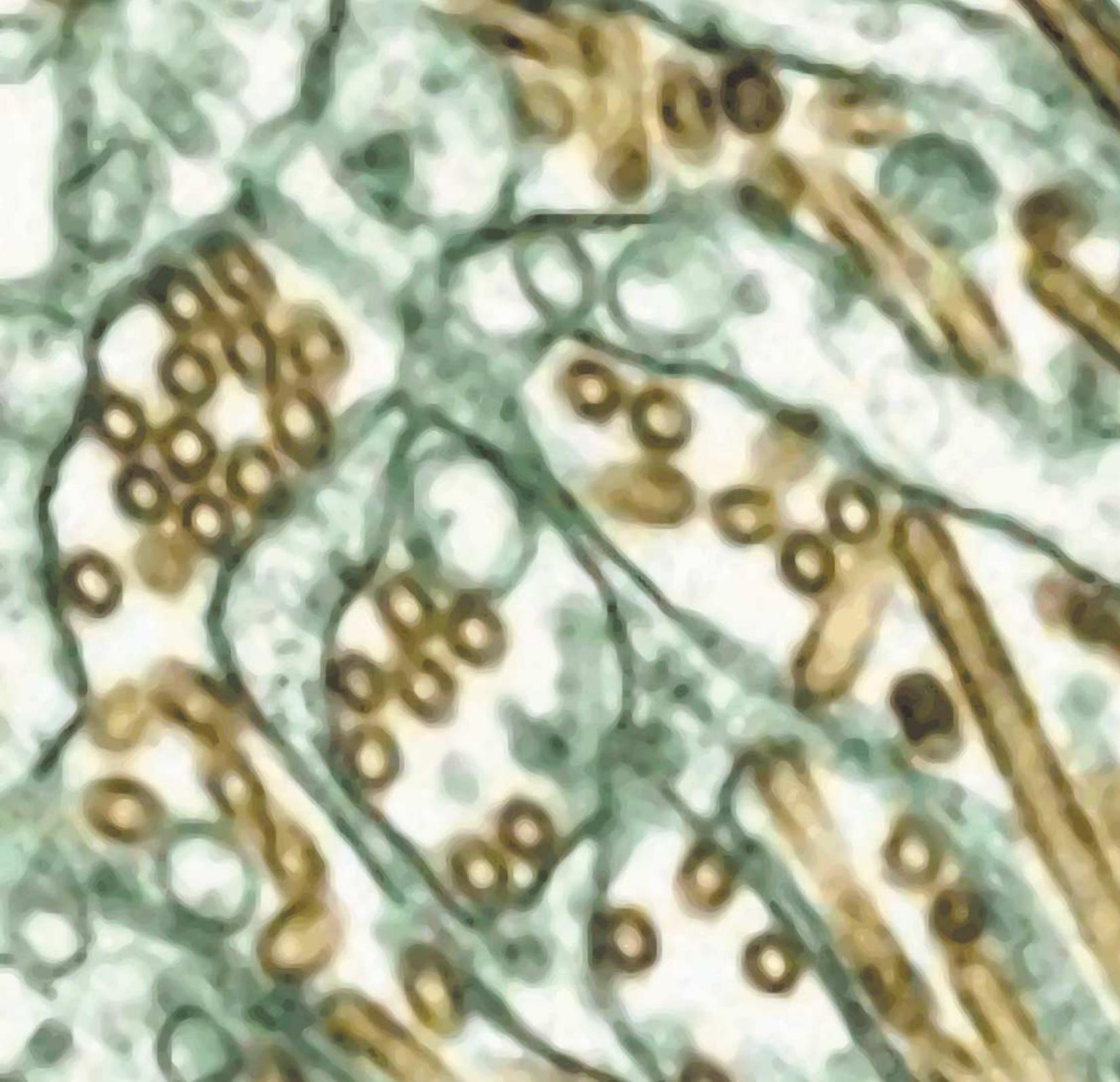
transmiten con la misma eficacia que los virus sensibles al fármaco, y de hecho en la naturaleza se pueden aislar virus con cambios en el gen M2 que son de por sí resistentes a la amantadina. Mayoritariamente los virus resistentes contienen mutaciones que afectan a un sólo aminoácido de la proteína M2.

También se han aislado virus resistentes a los inhibidores de la NA tanto en ensayos in vitro (tras pases seriados del virus en un medio que contiene el antiviral) como de pacientes tratados terapéuticamente con estos antivirales y, mayoritariamente, los virus aislados contienen mutaciones en la NA. En estudios en población pediátrica se han aislado virus resistentes en un 5-18% de los niños tratados con oseltamivir, mientras que en estudios clínicos con zanamivir únicamente se ha encontrado un aislado clínico resistente al fármaco procedente de un niño inmunodeprimido. Hay que considerar, no obstante, que el número de estudios realizados con los inhibidores de la NA es escaso dada la reciente incorporación de estos fármacos al arsenal terapéutico. Varias de las mutaciones encon-

tradas en el gen de la NA de los virus resistentes reducen la patogenicidad y transmisibilidad de estos virus en modelos animales. Una situación similar en humanos tendría una enorme importancia desde el punto de vista clínico. Sin embargo, hay que ser cautos pues los estudios realizados son limitados, y de hecho también se han descrito virus resistentes que crecen bien y se transmiten eficientemente entre animales (Herlocher et al., 2004).

Los antivirales serán la única arma para hacer frente a la pandemia en los estadios iniciales de la misma. Serán útiles para retrasar la extensión de la pandemia y para utilizarlos de forma profiláctica y terapéutica antes de que se disponga de una vacuna eficaz. No obstante hay que tener en cuenta que al no saber cual será el virus pandémico su efectividad real sólo se podrá comprobar cuando se declare la próxima pandemia.





■ 8. Referencias

- Area, E., Martín-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. and Ortín, J. (2004) Three-dimensional structure of the influenza virus RNA polymerase: localization of subunit domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 308-313.
- Astorga, R., Maldonado, A., Tarradas, C., Arenas, A. and Perea, A. (1996) Infecciones en aves acuáticas no anátidas de Doñana: Estudio epidemiológico. *Oxyura*, **8**, 93-101.
- Astorga, R., Tarradas, C., Maldonado, A., Arenas, A., Luque, I., Vicente, S. and Perea, A. (1994) Estudio de infecciones en anátidas silvestres del Parque Nacional de Doñana. *Oxyura*, **7**, 213-219.
- Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1994) Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*, **371**, 37-43.
- Capua, I. and Marangon, S. (2003) Vaccination in the control of avian influenza in the EU. *Vet Rec*, **152**, 271.
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R. and Yewdell, J.W. (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, **7**, 1306-1312.
- Coiras, M.T., Pérez-Breña, P., García, M.L. and Casas, I. (2003) Simultaneous detection of influenza A, B and C viruses, RSV and adenoviruses in clinical samples by multiplex RT-PCR. *J. Med. Virol.*, **69**, 132-144.
- Coiras, M.T., Pérez-Breña, P., García, M.L. and Casas, I. (2004) Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J. Med. Virol.* **72**, **69**, 488-495.
- Colman, P.M., Varghese, J.N. and Laver, W.G. (1983) Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*, **303**, 41-44.
- Cox, R.J., Brokstad, K.A. and Ogra, P. (2004) Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol*, **59**, 1-15.

- Crawford, P.C., Dubovi, E.J., Castleman, W.L., Stephenson, I., Gibbs, E.P., Chen, L., Smith, C., Hill, R.C., Ferro, P., Pompey, J., Bright, R.A., Medina, M.J., Johnson, C.M., Olsen, C.W., Cox, N.J., Klimov, A.I., Katz, J.M. and Donis, R.O. (2005) Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science*, **310**, 482-485.
- de Jong, M.D., Bach, V.C., Phan, T.Q., Vo, M.H., Tran, T.T., Nguyen, B.H., Beld, M., Le, T.P., Truong, H.K., Nguyen, V.V., Tran, T.H., Do, Q.H. and Farrar, J. (2005) Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med*, **352**, 686-691.
- Domingo, E. and Holland, J.J. (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*, **51**, 151-178.
- Fenner, F. (1999) *Veterinary Virology*. Academic Press, London.
- Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T. and Kawaoka, Y. (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2002-2007.
- Garcia-Sastre, A. (2001) Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology*, **279**, 375-384.
- Harvey, R., Martin, A.C., Zambon, M. and Barclay, W.S. (2004) Restrictions to the adaptation of influenza A virus H5 hemagglutinin to the human host. *J Virol*, **78**, 502-507.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P. and Kawaoka, Y. (2001) Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*, **293**, 1840-1842.
- Herlocher, M.L., Truscon, R., Elias, S., Yen, H.L., Roberts, N.A., Ohmit, S.E. and Monto, A.S. (2004) Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. *J Infect Dis*, **190**, 1627-1630.
- Iwatsuki-Horimoto, K., Kanazawa, R., Sugii, S., Kawaoka, Y. and Horimoto, T. (2004) The index influenza A virus subtype H5N1 isolated from a human in 1997 differs in its receptor-binding properties from a virulent avian influenza virus. *J Gen Virol*, **85**, 1001-1005.
- Klenk, H.D., Rott, R., Orlich, M. and Blodom, J. (1975) Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*, **68**, 426-439.
- Lamb, R.A. and Krug, R.M. (1996) Orthomyxoviruses: the viruses and their replication. In Fields, B.N.e.a. (ed.), *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1353-1395.

- León, L. (2004) Infecciones en las poblaciones de ánsar común (*Anser anser*) emigradas al Parque Nacional de Doñana. *Memoria anual de Actividades y Resultados de Gestión e Investigación en el Parque Nacional de Doñana*.
- Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J., Xu, K.M., Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepangestie, A.T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T., Webby, R.J., Poon, L.L., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G. and Peiris, J.S. (2004) Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, **430**, 209-213.
- Martín-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. and Ortín, J. (2001) Three dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Reports*, **2**, 313-317.
- Meijer, A., Valette, M., Manuguerra, J.C., Perez-Brena, P., Paget, J., Brown, C. and van der Velden, K. (2005) Implementation of the community network of reference laboratories for human influenza in Europe. *J Clin Virol*, **34**, 87-96.
- Miller, M.R., Takekawa, J.Y., Fleskes, J.P.O., D.L., Casazza, M.L. and Perry, M. (2005) Spring migration of Northern Pintails from California's Central Valley wintering area tracked with satellite telemetry: routes, timing and destinations. *Can. J. Zool.*, **83**, 1314-1332.
- Moscona, A. (2005) Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med*, **353**, 1363-1373.
- Neumann, G., Brownlee, G.G., Fodor, E. and Kawaoka, Y. (2004) Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol*, **283**, 121-143.
- Parvin, J.D., Moscona, A., Pan, W.T., Leider, J.M. and Palese, P. (1986) Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J. Virol.*, **59**, 377-383.
- Pinto, L.H., Holsinger, L.J. and Lamb, R.A. (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, **69**, 517-528.
- Portela, A. and Digard, P. (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*, **83**, 723-734.
- Portela, A., Zürcher, T., Nieto, A. and Ortín, J. (1999) Replication of Orthomyxoviruses. *Adv. Virus Res.*, **54**, 319-348.
- Russell, C.J. and Webster, R.G. (2005) The genesis of a pandemic influenza virus. *Cell*, **123**, 368-371.
- Schaub, M. and Jenni, L. (2001) Stopover durations on three warbler species along their autumn migration route. *Oecologia*, **128**, 217-227.

- Smith, D.J., Lapedes, A.S., de Jong, J.C., Bestebroer, T.M., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D. and Fouchier, R.A. (2004) Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*, **305**, 371-376.
- Steinhauer, D.A. (1999) Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, **258**, 1-20.
- Sturm-Ramirez, K.M., Hulse-Post, D.J., Govorkova, E.A., Humberd, J., Seiler, P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Chaisingh, A., Long, H.T., Naipospos, T.S., Chen, H., Ellis, T.M., Guan, Y., Peiris, J.S. and Webster, R.G. (2005) Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? *J Virol*, **79**, 11269-11279.
- Suárez, P. and Ortín, J. (1994) An estimation of the nucleotide substitution rate at defined positions in the influenza virus haemagglutinin gene. *J. Gen. Virol.*, **75**, 389-393.
- Subbarao, E.K., Kawaoka, Y. and Murphy, B.R. (1993) Rescue of an influenza A virus wild-type PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature-sensitive and attenuating mutation. *J Virol*, **67**, 7223-7228.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. and Cox, N. (1998) Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, **279**, 393-396.
- Templeton, K.E., Scheltinga, S.A., Beersma, M.F., Kroes, A.C. and Claas, E.C. (2004) Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol*, **42**, 1564-1569.
- Tran, T.H., Nguyen, T.L., Nguyen, T.D., Luong, T.S., Pham, P.M., Nguyen, V.C., Pham, T.S., Vo, C.D., Le, T.Q., Ngo, T.T., Dao, B.K., Le, P.P., Nguyen, T.T., Hoang, T.L., Cao, V.T., Le, T.G., Nguyen, D.T., Le, H.N., Nguyen, K.T., Le, H.S., Le, V.T., Christiane, D., Tran, T.T., Menno de, J., Schultsz, C., Cheng, P., Lim, W., Horby, P. and Farrar, J. (2004) Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med*, **350**, 1179-1188.
- Tumpey, T.M., Basler, C.F., Aguilar, P.V., Zeng, H., Solorzano, A., Swayne, D.E., Cox, N.J., Katz, J.M., Taubenberger, J.K., Palese, P. and Garcia-Sastre, A. (2005) Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*, **310**, 77-80.
- WHO, T.W.C.o.t. (2005) Avian influenza (H5N1) infections in humans. *New Engl. J. of Med.*, **353**, 1374-1385.

- Wiley, D.C. and Skehel, J.J. (1987) The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 365-394.
- Wright, P.F. and Webster, R.G. (2001) Orthomyxoviruses. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 1533-1579.
- Wuethrich, B. (2003) Infectious disease. Chasing the fickle swine flu. *Science*, **299**, 1502-1505.
- Zambon, M. (1998) Laboratory diagnosis of influenza. In Nicholson, K.G., Webster, R.G. and Hay, A.J. (eds.), *Text book of influenza*. Blackwell Science, Oxford, pp. 291-313.

Es tiempo de investigación,
es tiempo de vida...
es tiempo CSIC



Es tiempo de investigación,
es tiempo de vida...
es tiempo CSIC

Enero de 2006