



Infecciones producidas por los virus de la gripe aviar A (H5N1) en las poblaciones de aves del sudeste asiático y en la especie humana

Pilar Pérez-Breña e Inmaculada Casas

Servicio de Virología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.

La gripe aviar afecta a la mayoría de las aves y produce epidemias en granjas. La enfermedad fatal se denomina "gripe aviar altamente patogénica" y se relaciona con el virus *Influenza A* de los subtipos H5 y H7. El reservorio natural son las aves migratorias que infectan accidentalmente a las aves domésticas. En 1997, en Hong Kong, 18 personas se infectaron por virus A(H5N1) y seis de ellas fallecieron. Al final de 2003 y principio de 2004, el mismo subtipo infectó numerosas granjas en países del sureste asiático. Este virus fue transmitido a 34 personas en contacto directo con aves infectadas y 23 personas fallecieron. La intensa investigación en curso sobre virus H5N1 se centra principalmente en su alta tasa de evolución, virulencia, probabilidad de producción de recombinantes con otros virus *Influenza*, variantes H5N1 capaces de infectar al ser humano o aproximaciones al desarrollo de vacunas eficaces.

Palabras clave: Gripe aviar. Influenza A(H5N1). Factores de virulencia. Evolución de virus *Influenza*.

Avian influenza A (H5N1) infectious in both birds and humans in South-Eastern Asian countries

Avian influenza affects most types of birds and occurs in epidemics on poultry farms. The fatal disease is named "highly pathogenic avian influenza" and is caused by influenza A virus subtypes H5 and H7. The natural reservoir is the migratory waterfowl that occasionally infects domestic poultry. In 1997 in Hong Kong, 18 persons were infected and 6 of them died. At the end of 2003 and the beginning of 2004, avian influenza H5N1 infected numerous farms in several South-Eastern Asian countries. The virus was transmitted to humans in close contact with infected birds. A total of 34 persons were infected and 23 of them died. There is currently a

considerable concern about the H5N1 avian influenza that has infected humans: the high virulence, evolution rate, the possibility of recombination with other influenza viruses, how H5N1 variants that infect humans or different approaches to the development of influenza vaccines.

Key words: Avian Influenza. Influenza A(H5N1). Virulence factors. Influenza evolution.

Introducción

Desde diciembre de 2003, un virus de gripe A (H5N1) está causando brotes en las aves de la mayoría de los países del este y sureste asiático produciendo una alta mortalidad en las granjas avícolas y pérdidas económicas cuantiosas. El mismo virus ha originado también infecciones humanas de una elevada letalidad, ya que hasta el momento actual se han declarado 35 casos humanos confirmados, de los que 23 han sido fatales. Este virus había generado anteriormente otros brotes en aves domésticas. Es, por tanto, un virus típicamente aviar que ha cruzado la barrera interespecie originando un brote zoonótico. De momento no se ha demostrado la transmisión persona a persona, por lo que la grave amenaza para el hombre no se ha materializado, pero sigue abierta la posibilidad de que estas infecciones puedan constituir el comienzo de una nueva pandemia gripeal, según alerta la Organización Mundial de la Salud (OMS). La situación actual no tiene precedente tampoco desde el punto de vista de la salud animal, ya que todavía no ha podido controlarse la expansión de los brotes que continúan apareciendo en algunos de los países implicados.

Aspectos virológicos de la gripe

Los virus de la gripe pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y su aspecto al microscopio electrónico es pleomórfico, aunque tiendiendo a la esfericidad. Poseen una envoltura lipídica perteneciente a la célula infectada en la que se insertan los antígenos de superficie. Esta envuelta encierra las estructuras internas, cuya misión es proteger al genoma de ARN fragmentado y de polaridad negativa, así como al complejo de la polimerasa, que es el principal responsable de la replicación del virus en el interior del núcleo celular. Así pues, estructuralmente los virus de la gripe están constituidos por dos tipos de componentes pro-

Correspondencia: Dra. P. Pérez-Breña.
Servicio de Virología. Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud Carlos III.
Ctra. de Majadahonda-Pozuelo, km 2. 28220 Majadahonda. Madrid. España.
Correo electrónico: pperez@isciii.es

Manuscrito recibido el 11-5-2004; aceptado el 14-5-2004.

teicos, los correspondientes a los antígenos internos (fundamentalmente proteína M1 y NP, que con el ARN y polimerasas, PB1 PB2 y PA constituyen las nucleocápsidas) y las proteínas de membrana o antígenos de superficie (hemaglutinina [HA], neuraminidasa [NA] y proteína M2)¹. Las proteínas de superficie son las que condicionan más fuertemente la relación virus-huésped y la capacidad infecciosa. La HA es el antígeno responsable de la unión del virus al receptor celular y también de la fusión de las membranas celular y viral, lo que permite la liberación de las nucleocápsidas virales en el citoplasma. Por estas razones, en la HA se encuentran localizados los lugares antigenicos a los que van dirigidos los anticuerpos neutralizantes que protegen de siguientes infecciones por virus homólogos. Para alcanzar su actividad biológica, la HA nativa debe sufrir una rotura proteolítica producida por proteasas específicas de tipo tripsina, que sólo están presentes en tejidos epiteliales, lo que en la práctica supone una limitación del tropismo del virus al aparato respiratorio. La NA tiene una función enzimática, eliminando los restos de ácido siálico de la superficie de la célula infectada, lo que facilita la liberación de las progenies de nuevos virus al medio extracelular y por tanto la infección de nuevas células. Su papel en la infección y en la transmisión es también muy relevante, como lo son los anticuerpos dirigidos contra ella, aunque menos que el de la HA. Finalmente, la proteína M2 está presente en pequeñas cantidades en el virus y forma canales iónicos que permiten el paso de protones a través de la envuelta.

Atendiendo a los antígenos internos estructurales, M1 y NP, los virus gripeales se clasifican en tres tipos denominados *Influenza A, B y C*. Los virus del tipo A se dividen a su vez en subtipos según los antígenos de superficie principales HA y NA. En la naturaleza se han aislado 15 serotipos diferentes de HA (H1-H15) y 9 de NA (N1-N9), que se mezclan entre sí produciendo un buen número de combinaciones que circulan en diversas especies de animales, entre ellas el ser humano. Todos los subtipos identificados hasta ahora son capaces de infectar a las aves, aunque el grado de enfermedad que producen en ellas es muy variable, y pueden encontrarse infecciones cuyo rango de gravedad va desde asintomáticas a fatales. La generación de subtipos antigenicos es un acontecimiento drástico que se conoce como cambio antigenico mayor o *shift* y se limita a los virus del tipo A. El origen de estos cambios es el intercambio o recombinación de genes entre virus circulantes en ésta o en distintas especies, lo que implicaría un salto interespecie. Pero también se acepta la posibilidad de la reemergencia de un virus que hubiera dejado de circular hace tiempo, permaneciendo en un reservorio, natural o no, como pueden ser las zonas de grandes hielos o bien el congelador de un laboratorio, de donde hubiera podido escapar. Por otra parte, la transmisión interespecie, aunque existente, se produce con dificultad, permitiendo la evolución independiente de las cepas específicas de cada huésped.

A parte de la generación de nuevos subtipos, la evolución en los virus gripeales está ligada a la aparición de mutaciones puntuales, que se producen, como en otros virus ARN, por la facilidad de generar errores de las ARN polimerasas ARN dependientes que, además, no poseen capacidad autocorrectora. Estos cambios genéticos originan una deriva antigenica o *drift*, que afecta a los tipos A y B

y en menor medida al C. Las mutaciones que se acumulan en los determinantes antigenicos de HA y NA, originan cepas variantes que se separan de manera paulatina de los virus que circulaban hasta ese momento y a los que van sustituyendo, como resultado de la selección producida por la presión de la inmunidad adquirida por la población. Las dificultades para producir vacunas frente a virus tan cambiantes y el temor a la aparición de virus nuevos que pudieran originar grandes epidemias o pandemias, llevó a la OMS a establecer en 1947 un sistema de vigilancia mundial de gripe. En esencia se trataba de aislar y caracterizar virus procedentes en todos los países del mundo, con el fin de actualizar la composición de las vacunas cada 6 meses, en caso de que aparecieran cepas variantes y, más aún, si se detectaba un virus emergente. Este sistema consta en la actualidad de 110 Centros Nacionales de Gripe repartidos por todo el globo. La declaración de los datos virológicos, acompañados en lo posible de datos epidemiológicos, y el acceso a la información generada, se realizan a través de Internet mediante un sistema denominado FluNet (<http://oms.b3e.jussieu.fr/flunet/>). En Europa funciona además el EIIS, que es un proyecto común de vigilancia de la gripe entre los estados europeos (<http://www.eiss.org/index.cgi>).

Patogenicidad de los virus de la gripe aviar

Ya que los virus de la gripe poseen un genoma segmentado, no ha sido difícil producir *in vitro* virus recombinantes con el fin de examinar cuáles de sus genes están implicados en la virulencia. Utilizando virus aviares de alta (High Pathogenic Avian Influenza o HPAI) y baja patogenicidad, se pudo demostrar que el gen que codifica para la HA es decisivo para determinar la virulencia. Más tarde se comprobó que la virulencia de los virus de la gripe es un fenómeno poligénico, en el que, junto con la HA, participan otros genes, como el de la proteína NS1 o el de la polimerasa PB2. La capacidad de los subtipos HPAI de producir "placas" en las monocapas celulares infectadas en ausencia de tripsina en el medio de cultivo, ha sido uno de los ensayos básicos para el estudio de la virulencia. Permitió deducir que la formación de este tipo de placas se debía a la existencia de una HA que presentaba una secuencia característica, junto al sitio del corte proteolítico (corte necesario para que se produzca la activación de esta proteína). Cuando la HA evoluciona adquiriendo este tipo de secuencia, las proteasas presentes en la mayoría de los tejidos pueden realizar la proteólisis, lo que confiere al virus la capacidad de infectar todo tipo de células y órganos sin restricciones, convirtiéndose el virus en una cepa HPAI. En cambio las variantes no virulentas presentan un tropismo restringido al tracto respiratorio e intestinal, donde existen enzimas específicas para esta proteólisis. La mayoría de los virus de la gripe A presentan una arginina (R) en el extremo carboxiterminal de la subunidad HA1 y una glicina (G) en el extremo aminoterminal de la subunidad HA2. Cuando se analizaron los virus H5 se encontró que próximo al extremo carboxiterminal de la HA1 existía una glutamina conservada (Q). Entre la glutamina (Q) y la glicina (G) existe una región de conexión entre péptidos, que varía en extensión y composición aminoácida en función de la cepa de virus H5 que se analice. Los

virus no virulentos tienen cuatro aminoácidos en el péptido de conexión: Q-R-E-T-R/G (E: ácido glutámico; T: treonina). En los virus que mantienen su no virulencia y que presentan residuos básicos se ha demostrado la presencia de una cadena lateral carbohidratada cercana al punto de corte y la secuencia de aminoácidos del péptido de conexión es: Q-K-K-K-R/G (K: lisina). Contrariamente cuando la cadena carbohidratada lateral no existe el mismo número de residuos básicos dotan a la cepa de altos niveles de virulencia: Q-R-K-K-R/G. En los virus que presentan alta virulencia y que presentan una cadena carbohidratada, es necesario alargar el péptido de conexión aumentando el número de residuos básicos: Q-R-K-R-K-K-R/G². Esto ha podido comprobarse en virus que han adquirido un alto nivel de virulencia como los del subtipo H7N1 que circularon en Italia en 1999. Los virus HPAI del final del brote se compararon con los del comienzo, de baja virulencia, y se demostró en ellos la presencia de una secuencia de aminoácidos de carácter básico cerca del lugar de corte de la HA (P-K-G-S-R-V-R-R/G)³.

La proteína NS1 es otro de los principales factores de la virulencia de los virus gripeales. Es la única proteína no estructural del virus de la gripe, por lo que no forma parte de la partícula viral. Se produce al comienzo de la síntesis de proteínas virales y su ubicación cambia del núcleo al citoplasma a lo largo del ciclo de replicación viral, lo que le permite interaccionar con gran cantidad de factores virales y celulares. Es, por tanto, una proteína muy importante para la replicación del virus, y está implicada en varios pasos de la misma. Entre otras funciones, parece ser responsable de la interrupción de la biosíntesis de las macromoléculas de la célula⁴.

Estudios recientes han demostrado que los virus con baja patogenicidad pueden, tras muchos ciclos de infección en las aves domésticas, mutar y convertirse en virus HPAI. Esto se demostró mediante estudios de comparación de secuencias de virus no patogénicos y virus HPAI en brotes ocurridos en dos países: en Italia de 1999 a 2001, donde se produjeron brotes debidos al subtipo H7N1³, y en Estados Unidos, en que el subtipo H5N2 fue responsable de los brotes de los años 1983-1984⁵. En el primer caso, el virus se convirtió en HPAI en 9 meses y en el segundo tardó 6 meses.

La gripe aviar: la importancia de esta infección en las aves y en la especie humana

La gripe aviar es una infección altamente contagiosa que afecta a la mayoría de las aves y que con frecuencia se presenta en brotes epidémicos, sobre todo en el caso de aves que viven en estrecho contacto, como las de las granjas de producción avícola. Todas las aves pueden ser infectadas por los virus gripeales, pero algunas especies son más susceptibles que otras. Las aves migratorias en general, pero en especial los patos silvestres, que son muy resistentes a la infección⁶, constituyen un gran reservorio natural de virus gripeales. Los virus HPAI pueden permanecer infectivos durante largos períodos de tiempo en el medio ambiente, en particular si las temperaturas son bajas, como ocurre en los lagos cercanos al polo norte donde anidan los patos silvestres. Las aves domésticas (gallinas y pavos), son especialmente susceptibles a la infección por

las cepas HPAI, que son transmitidas por el contacto directo o indirecto que puede producirse con las aves silvestres migratorias. Los mercados de aves vivas de Asia y de algunos países americanos desempeñan un papel muy importante en la dispersión de estos brotes. Las variantes HPAI infectan a las aves domésticas de forma brusca, en una rápida progresión, llegándose a alcanzar una mortalidad cercana al 100% de las aves infectadas. Las aves que sobreviven presentan un período de excreción viral de 10 días en secreciones orales y heces, lo que hace que su capacidad de contagio sea muy alta.

Los subtipos de gripe aviar identificados en los últimos años son el H5, H7 y H9 y todos ellos han producido infecciones humanas por paso directo de las aves al hombre. Las pandemias de 1957 y de 1968 fueron en cambio debidas a virus generados por reagrupamiento genético entre virus de origen aviar y virus humanos que habían infectado conjuntamente al cerdo. El salto a la especie humana desde los animales domésticos, sobre todo aves y cerdos, tiene mucho que ver con las condiciones de proximidad y convivencia entre el hombre y los animales en algunas zonas del mundo. Los cerdos han sido una pieza clave en el acontecimiento de las pandemias humanas por ser susceptibles a la infección por virus aviares y de otros mamíferos, incluyendo los propios virus humanos. Así pues, han resultado ser una especie de vasija mezcladora en donde se produjeron las reagrupaciones genéticas originando un nuevo subtipo capaz de infectar al ser humano. Desde 1997 y, más recientemente, en los eventos ocurridos en 2003 y 2004, se ha demostrado además la posibilidad de transmisión directa de virus desde las aves al ser humano, sin necesidad de paso por el cerdo.

Desde 1959 hasta 2003 se han declarado en el mundo 21 brotes de gripe aviar producida por virus *Influenza* HPAI, a pesar de lo cual hasta el final de 2003, este tipo de gripe se consideraba una enfermedad de baja incidencia. La mayoría de estos brotes ocurrieron en Europa y América y sólo seis de ellos produjeron una elevada tasa de infección en numerosas granjas avícolas: 1983-1985 en Estados Unidos (Pensilvania); 1994-1995 en México; 1994 en Pakistán; 1997 en China (Hong Kong); 1999-2000 en Italia, y 2003 en Holanda (tabla 1). Hasta 1997 la gripe aviar era una enfermedad de aves que ocasionalmente afectaba a cerdos, lo que hace que la asociación de la infección del ser humano a este tipo de virus haya tenido gran repercusión desde el punto de vista científico y de la salud pública. Los brotes de gripe aviar ocurridos en el hombre se detallan a continuación:

1. El primer brote de gripe aviar conocido en el ser humano ocurrió en Hong Kong en 1997, aislándose un virus *Influenza* H5N1, HPAI, que ocasionó una infección respiratoria grave en 18 personas, de las que seis murieron. En ese momento, el mismo virus estaba produciendo una epidemia de gripe aviar en granjas de la zona. Desde entonces se han realizado numerosos estudios del brote de 1997 y se ha determinado que el origen de la infección en humanos se debió a un estrecho contacto entre el hombre y las aves infectadas. Los estudios genéticos revelaron que existió un salto inter especie desde las aves al hombre. El mecanismo por el que este virus aviar H5 ha logrado infectar al hombre mientras otros virus aviares no lo han hecho, es motivo de investigación en estos momentos. Los es-

TABLA 1. Brotes de gripe aviar ocurridos en los últimos 50 años en el mundo asociados a los subtipos que se han mostrado capaces de infectar al hombre, incluyendo tanto los originados por virus de alto poder patogénico (subtipos H5 y H7) como los de virulencia baja (subtipo H9)

Año	País	Aves domésticas infectadas	Cepa	Infección en humanos N.º de enfermos/n.º de muertes
1959	Escocia	Pollos	H5N1	0/0
1963	Inglaterra	Pavos	H7N3	0/0
1966	Canadá (Ontario)	Pavos	H5N9	0/0
1976	Australia (Victoria)	Pollos	H7N7	0/0
1979	Alemania	Pollos	H7N7	0/0
1979	Inglaterra	Pavos	H7N7	0/0
1983-1985	Estados Unidos (Pensilvania)	Pavos y pollos	H5N2	0/0
1983	Irlanda	Pavos	H5N8	0/0
1985	Australia (Victoria)	Pollos	H7N7	0/0
1991	Inglaterra	Pavos	H5N1	0/0
1992	Australia (Victoria)	Pollos	H7N3	0/0
1994	Australia (Queensland)	Pollos	H7N3	0/0
1994-1995	México	Pollos	H5N2	0/0
1994	Pakistán	Pollos	H7N3	0/0
1997	Australia (Nuevo Gales del Sur)	Pollos	H7N4	0/0
1997	China (Hong Kong)	Pollos Patos Gansos	H5N1	18/6
1997	Italia	Pollos	H5N2	0/0
1999-2000	Italia	Pavos	H7N1	0/0
1998-1999	China (República Popular)	Pollos	H9N2	5/0
1999	China (Hong Kong)	Pollos	H9N2	2/0
2002	Chile	Pollos	H7N3	0/0
2003	China (Hong Kong)	?	H5N1	2/1 brote familiar
2003	Holanda	Pollos	H7N7	89/1
	Bélgica			
	Alemania			
2003	China (Hong Kong)	?	H9N2	1/0
2004	Corea del Sur	Pollos	H5N1	35/23
	Tailandia	Patos		
	Camboya	Gansos		
	Vietnam			
	China (Hong Kong)			
	China (República Popular)			
	Japón			
	Indonesia			
	Laos			
2004	China (Taiwan)	Pollos	H5N2	0/0
2004	Pakistán	Pollos	H7N3	2/0
	Canadá (Columbia Británica)			

<http://www.eurosurveillance.org/ew/2004/040129.asp#1>

tudios más recientes del virus aislado en muestras clínicas humanas demuestran la existencia de mutaciones en la secuencia de aminoácidos de la zona de la HA que interviene en el reconocimiento de las cadenas ácido siálico-sacáridos del receptor celular⁷. Según el tipo de unión que el ácido siálico establece con el azúcar (que pueden ser α 2-3 o α 2-6, dependiendo de la especie animal de que se trate) la secuencia del punto de unión al receptor de la HA evoluciona adaptándose. Éste es el primer requisito para que pueda establecerse el salto interespecie. Por otra parte, el virus H5N1 (HPAI) tiene la capacidad de replicar en diferentes tipos de células y en consecuencia puede originar una infección grave diseminada multiorgánica que causa una elevada mortalidad. En el personal sanitario que se ocupó del cuidado de los enfermos de este brote no se ob-

servaron casos de enfermedad grave, por lo que se consideró que la transmisión del virus era muy ineficaz. Las medidas de control del brote se basaron en la rápida destrucción de las aves de Hong Kong para minimizar el contacto entre el ser humano y las aves, y se calcula que 1,5 millones de aves fueron sacrificadas en 3 días.

2. La segunda alarma ocurrió en febrero de 2003 en Hong Kong, cuando de nuevo un virus *Influenza* H5N1, HPAI (A/HongKong/213/03) infectó a dos personas de las que una murió⁸. Este brote estuvo restringido al ámbito familiar y se asoció a un virus *Influenza* que circulaba entre las aves domésticas produciendo brotes desde 2002⁹. Los análisis antigenicos demostraron que este virus presentaba un patrón genético diferente al del brote de 1997.

3. Desde mediados de diciembre de 2003, un total de 10 países asiáticos diferentes han confirmado brotes de gripe aviar asociados al subtipo H5N1, HPAI. La primera notificación fue realizada por las autoridades competentes de la República de Corea el 12 de diciembre de 2003 en una granja cercana a la capital, Seúl. En esta notificación se declaró la afectación repentina de 24.000 pollos, de los que 19.000 habían muerto entre el 5 al 11 de diciembre. El 5 de enero las autoridades sanitarias de Vietnam informan que 12 niños habían sido ingresados en hospitales de Hanoi presentando una infección respiratoria aguda, que en ocho de los casos había resultado fatal. Posteriormente, el 8 de enero, nuevamente las autoridades de Vietnam notifican brotes de gripe aviar producidos por el virus *Influenza A* (H5N1) en diferentes granjas de las provincias del sur de este país. El 11 de enero notifican que algunos de los casos de infección respiratoria grave en niños habían sido producidos por un virus *Influenza H5N1* (A/Vietnam/1196/2004). La confirmación de laboratorio se realizó el 12 de enero y se demostró el salto interespecie de los virus H5N1 desde las aves al ser humano. También el 12 de enero las autoridades sanitarias de Japón anuncian la existencia de brotes de gripe aviar en aves y, posteriormente, el día 23 en Tailandia se declararon también brotes en granjas, con 2 casos humanos confirmados en laboratorio (A/Thailand/1-KAN-1/2004, A/Thailand/2-SP-33/2004). El cuadro se complica el mismo 23 de enero cuando Vietnam anuncia que los virus aislados de pacientes son resistentes a los antígrípales inhibidores de la M2, amantadina y rimantadina. Seguidamente, el día 27 el Ministerio de Sanidad de la República Popular de China anuncia la existencia de brotes de gripe aviar en granjas de patos del sur del país. Laos notifica la infección en una granja de ocas cercana a la capital Vientiane y Camboya se suma a los países notificantes. El 2 de febrero se notifica un brote en aves en Indonesia (tabla 2).

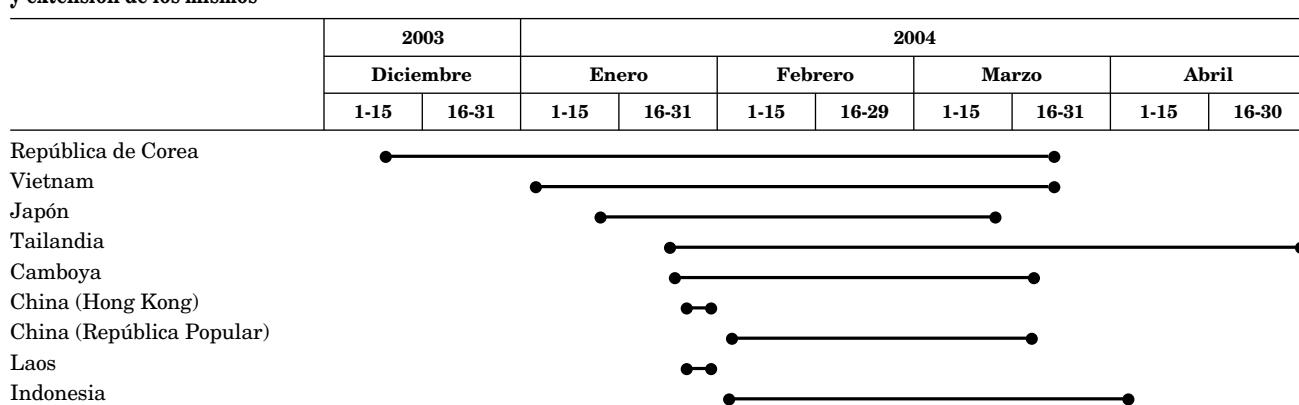
La mayoría de estos países asiáticos no habían tenido nunca este tipo de infección que ha llegado a afectar, en muchos de ellos, a la mayor parte de su territorio. Durante enero, febrero y marzo de 2004, más de 100 millones de aves han muerto por la infección o han sido sacrificadas. Las características del brote le hacen ser único por su distribución geográfica, la rapidez en la expansión del virus y especialmente por su gravedad (tabla 2). Cuando este bro-

te se compara con los ocurridos en años anteriores se puede de valorar la gravedad real, ya que los brotes anteriores tuvieron mucha menos extensión y desde el punto de vista de salud pública, menor repercusión. El 20 de febrero la OMS notificó la infección de gatos domésticos en una de las casas de un paciente infectado. Este hecho se ha documentado por primera vez en el mundo y se ha considerado como un evento raro, aunque de nuevo confirma el salto de la barrera interespecie entre aves y mamíferos.

El 9 de febrero, ante los casos humanos confirmados, la OMS declara el establecimiento del nivel 2 de la fase 0 en las actuaciones previstas en los planes pandémicos. Este nivel incluye: a) ayuda en la investigación del brote; b) reforzamiento de la vigilancia regional e internacional, y c) desarrollo y evaluación de vacunas frente a la nueva cepa del virus. El 19 de abril de 2004, Tailandia continúa notificando brotes, por lo que la OMS sigue indicando fase 0-nivel 2 de preparación global frente a una pandemia (http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_EDC_99_1/).

Clínicamente la infección por el virus H5N1 es diferente del cuadro gripe bien conocido y considerado normal en donde los síntomas respiratorios son los dominantes. El análisis del cuadro clínico de los pacientes del brote de gripe AH5N1 (2004), indica que es muy semejante al cuadro que presentaron los pacientes infectados en Hong Kong en 1997. Las primeras descripciones realizadas de los pacientes de Tailandia y Vietnam han sido coincidentes. El período de incubación se ha calculado entre 2-3 días, aunque puede ampliarse a un intervalo de entre 1 y 7 días. Los casos han aparecido con fiebre (38 °C), tos y dificultad respiratoria. Los síntomas de infección del sistema respiratorio inferior fueron evidentes desde el comienzo del cuadro, siendo diagnosticada la enfermedad mediante radiografía de tórax, en la que se apreciaba neumonía con cambios no específicos, infiltrados difusos, multifocales e intersticiales, llegando a una consolidación lobular o segmental. La infección progresaba rápidamente y llegaba a producir fallo respiratorio 1 semana después del comienzo de los síntomas clínicos, necesitando los pacientes ventilación asistida. En el 50% de los casos aproximadamente se producía diarrea y en otros hepatitis, insuficiencia renal y afectación de más órganos que en la gripe habitual. Los hallazgos de laboratorio se resumen en linfopenia, y

TABLA 2. Cronología de las declaraciones de los brotes producidos por virus A (H5N1) en los diferentes países asiáticos y extensión de los mismos



un ligero a moderado aumento de la alaninoaminotransferasa y la aspartatotransaminasa¹⁰. Hasta principios de mayo se han producido 35 casos humanos, 23 de los cuales han fallecido. La edad de los pacientes afectados es baja, siendo los niños y adolescentes los principales afectados. La OMS ha establecido unas normas de actuación para el tratamiento clínico de los pacientes infectados (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/).

Virológicamente se han analizado al menos cinco virus humanos y 33 animales. En la comparación de las secuencias se observa que los virus de 2004 son bastante diferentes a los aislados en el brote de Hong Kong en 1997 e incluso a los de 2003. De hecho, no reaccionan eficazmente con los antisueros correspondientes al virus A (H5N1) de 1 caso humano de Hong Kong de 2003. En cambio, son muy semejantes a los aislados recientemente en China de patos y gansos. Esto no implica que necesariamente los brotes actuales se hayan originado en China, sino que indica que ha habido una circulación muy amplia de este tipo de virus aviares en todo el sudeste asiático. Los ocho segmentos genómicos de los virus aislados en los casos humanos de 2004 son de origen aviar, de lo que se deduce que no se ha producido reagrupación entre el virus aviar A (H5N1) y alguno de los subtipos gripeales que habitualmente circulan en el hombre (H1N1, H3N2 y recientemente H1N2). Además no se ha establecido la existencia de transmisión de persona a persona.

4. Otros dos virus de *Influenza* aviar han resultado ser infecciosos para el ser humano. Por una parte, en Hong Kong, en 1999, se produjeron 2 casos de infección leve en 2 niños, asociadas a un virus *Influenza* H9N2. Posteriormente, a mediados de diciembre de 2003, se ha comunicado otro caso de infección leve en un niño debido al mismo subtipo H9N2. Además de estos casos, un brote del subtipo H7N7 HPAI se extendió por Holanda de febrero a abril de 2003, produciendo 83 casos de enfermedad de gravedad mediana y la muerte de un veterinario, que trabajaba en las granjas y que no había querido ni vacunarse ni utilizar los antivirales recomendados por la OMS como profilaxis para este grupo de población considerado en riesgo especial (trabajadores en granjas avícolas).

5. Paralelamente a la circulación de los virus H5N1 en 2004, se ha declarado en Pakistán el 28 de enero y en Canadá el 2 de abril, la existencia de brotes en aves producidos por cepas HPAI del subtipo H7. El primer caso humano asociado a H7 en esta nueva etapa, se ha producido en la Columbia Británica (Canadá) el 5 de abril. Afortunadamente, este caso sólo ha desarrollado un cuadro de conjuntivitis y el paciente fue tratado con oseltamivir, recuperándose completamente.

Control de la gripe aviar

En los comienzos del siglo XXI, la vacunación continúa siendo el método más eficaz de control de la infección gripeal en el hombre. Desde que en el año 1933 se pudo aislar e identificar el virus responsable de la gripe humana, inocularon hurones, comenzó la carrera para desarrollar vacunas antigripales eficaces. En los últimos años, a causa de los brotes de gripe aviar ya descritos, se ha potenciado la investigación para el desarrollo de vacunas frente a virus A (H5N1) y en especial frente a las cepas HPAI. Dada

su gran virulencia en embriones de pollo las estrategias tradicionales de producción de vacunas no han sido viables, por lo que ha sido necesario preparar una cepa vacunal modificada mediante genética reversa^{11,12}. Hace unos meses se había conseguido preparar una cepa vacunal H5N1 efectiva frente a los virus que infectaron al ser humano en febrero de 2003, pero como consecuencia de su alta variabilidad (1997 frente a 2003 frente a 2004), esta cepa candidata vacunal no sirve frente a los subtipos actuales de 2004. Por ello, ha sido necesario volver a preparar una nueva cepa candidata, con la esperanza de que pueda utilizarse en un tiempo relativamente corto en los actuales grupos de riesgo (tabla 3). Este trabajo se está realizando en los laboratorios del National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC) en Londres (Reino Unido), en el CDC en Atlanta y en St. Jude Children's Research Hospital en Memphis (EE.UU.). En esencia consiste en insertar los genes que codifican para los 2 antígenos de superficie (H5 y N1) procedentes del virus aviar HPAI de 2004 en un virus no virulento (A/PR/8/34, H1N1), usado habitualmente en los laboratorios de gripe y optimizado para el crecimiento en huevos de gallina.

El pasado 30 de enero de 2004, la OMS recomendó la vacunación antigripal con la vacuna de la temporada en curso (que contiene virus A (H3N2), A (H1N1) y B) a las personas que estuvieran en riesgo alto de exposición al virus de la gripe H5N1 que estaba empezando a circular en varios países asiáticos en aves domésticas (tabla 3). El objetivo de esta recomendación no era protegerlos frente a la gripe aviar, sino disminuir la probabilidad de la infección gripeal habitual en estos individuos y en consecuencia evitar una posible infección simultánea de virus aviares y humanos. De esta forma se espera que se reduzcan las posibilidades de recombinación genética y, por tanto, la emergencia de un nuevo virus de la gripe con potencial pandémico.

Como complemento para la protección de estos mismos grupos de riesgo, el uso de antivirales puede tener como objetivo la prevención o el tratamiento de la infección gripeal. Los datos de secuenciación de aislados humanos A (H5N1) de los brotes de Tailandia y Vietnam mostraron que los virus presentaban características genéticas asociadas a resistencias frente a la amantadina y la rimantadina, tal como se ha comprobado en ensayos posteriores. En

TABLA 3. Grupos de personas considerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en alto riesgo de sufrir una infección por virus de la gripe aviar y a los que se han recomendado medidas especiales de vacunación, uso de antivirales y de medidas adicionales de protección personal en enero de 2004

1. Personas que esperan tener un contacto directo con las aves infectadas:
 - a) Trabajadores implicados en el sacrificio de las aves
 - b) Personas que viven y trabajan en las granjas avícolas en donde se haya declarado infección o sospecha de infección por virus de la gripe A (H5N1)
2. Trabajadores sanitarios al cargo de pacientes infectados con gripe aviar
3. Trabajadores sanitarios en servicios de urgencia en zonas en donde se haya confirmado infección de aves con gripe A (H5N1)

cambio son susceptibles a oseltamivir y parece que también a zanamivir (las pruebas están todavía en marcha), que son fármacos inhibidores de la función de la neuramidasa. Aunque la administración masiva de estos fármacos no es viable en la actualidad, debido a su elevado coste y a su disponibilidad limitada, se están utilizando para la protección individual de los trabajadores de la industria avícola, juntamente con las recomendaciones de vacunas y con las de uso de medidas de protección personal, como mascarillas, gafas y ropa protectora (tabla 3).

Lo mismo que se han establecido sistemas de control basados en la vacunación del ser humano existen vacunas antigripales aviares eficaces y evaluadas en pollos y pavos. Las más utilizadas son vacunas de virus inactivados administradas intramuscularmente. Esta forma de administración representa un inconveniente importante, ya que dificulta las vacunaciones masivas. Cuando los animales vayan a ser utilizados como alimento, la vacunación debe realizarse al menos 42 días antes del sacrificio de los mismos. Esto es incompatible con la edad a la que se sacrifican los pollos, que es entre las 6 y 7 semanas de vida. Materialmente no es posible su vacunación. Por otra parte, las vacunas inactivadas producen protección únicamente frente a los virus del mismo subtipo de HA, por ejemplo, H5, pero no frente a los de subtipos heterólogos (p. ej., H7 y H9), por lo que la protección que se alcanza frente a la gripe aviar como entidad no es completa. Sin embargo, los pollos producen anticuerpos capaces de dar reacciones cruzadas con antígenos poco variables, como la nucleoproteína, lo que dificulta realizar una vigilancia serológica de la vacunación. Las vacunas de virus vivos atenuados, que podrían ser una buena alternativa, puesto que su administración se realiza depositando una gota en el ojo de las aves, no se recomiendan para evitar la producción de nuevos recombinantes y también por la posibilidad de que se produzcan virus HPAI tras varios ciclos de replicación. Las vacunas construidas mediante genética inversa pueden ser una solución a los problemas planteados con las vacunas inactivadas. Los niveles de producción de anticuerpos que pueden provocar los componentes de estas vacunas recombinantes son muy altos, por lo que podrían llegar a desplazar a las actuales vacunas inactivadas¹³.

Además de la vacunación se aplican medidas físicas de contención de la infección aviar y su extensión a otros lugares geográficos. La primera medida de control puesta en marcha ha sido el sacrificio masivo de pollos en un radio de 5 km alrededor de todas las granjas infectadas. Se trata de una medida muy controvertida por las grandes pérdidas económicas que origina y porque es difícil asegurar su cumplimiento dentro de unas normas de seguridad para los trabajadores que participen en ellas (eliminación de aves y despojos), pero se mantiene por haberse demostrado como la medida más eficaz (<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2004/35988/index.html>). Se complementa con la cuarentena de las granjas infectadas. Se han definido también sistemas de control dentro de las propias

granjas, mediante procedimientos exhaustivos de limpieza. Entre granja y granja el objetivo es evitar la transmisión mecánica que puede producirse a través de vehículos, maquinaria, piensos, trabajadores comunes o intercambio de animales. Otro tipo de medidas están encaminadas a controlar la transmisión generada en las cadenas de comercialización. La Unión Europea y Estados Unidos han suspendido la importación de aves exóticas como medida precautoria ya que, como ejemplo, en 2003 se importaron unas 100.000 aves de estas características, especialmente procedentes de Pakistán, China e Indonesia. También se ha restringido en muchos países la importación de pollos y huevos e incluso de sus productos ya preparados¹⁴ (http://europa.eu.int/rapid/start/cgi/guesten.ksh?p_action.gettxt=gt&doc=IP/04/95|0|RAPID&lg=en&display=).

Bibliografía

1. Robert A, Lamb and Robert M, Krug K. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication, fields virology. Cap. 46. 3rd ed. New York: Lippincott W & W, 2001.
2. Kawaoka Y, Naeve CW, Webster RG. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? *Virology* 1984;139:303-16.
3. Banks J, Speidel ES, Moore E, Plowright L, Piccirillo A, Capua I, et al. Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Arch Virol* 2001;146:963-73.
4. Donelan NR, Basler CF, García-Sastre A. A recombinant influenza A virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice. *J Virol* 2003;77:13257-66.
5. Saito T, Horimoto T, Kawaoka Y, Senne DA, Webster RG. Emergence of a potentially pathogenic H5N2 influenza virus in chickens. *Virology* 1994;201: 277-84.
6. Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can J Microbiol* 1980;26: 622-9.
7. Iwatsuki-Horimoto K, Kanazawa R, Sugii S, Kawaoka Y, Horimoto T. 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* 2004;85:1001-5.
8. Peiris JS, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng WF, Nicholls JM, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 2004;21:363:617-9.
9. Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, Bissett L, Dyrting K, Rehg JE, et al. Reemerging H5N1 Influenza Viruses in Hong Kong in 2002 Are Highly Pathogenic to Ducks. *J Virol* 2004;1:78:4892-901.
10. Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen VC, et al. World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 2004;18:350:1179-88.
11. Liu M, Wood JM, Ellis T, Krauss S, Seiler P, Johnson C, et al. Preparation of a standardized, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics. *Virology* 2003;314:580-90.
12. Webby RJ, Pérez DR, Coleman JS, Guan Y, Knight JH, Govorkova EA, et al. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet* 2004;363:1099-103.
13. Qiao CL, Yu KZ, Jiang YP, Jia YQ, Tian GB, Liu M, et al. Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Dis* 2003;47(3 Suppl):1127-30.
14. European Commission. Commission suspends EU poultry imports from Thailand after avian influenza outbreak. Press release IP/04/95, 23 January 2004. (http://europa.eu.int/rapid/start/cgi/guesten.ksh?p_action.gettxt=gt&doc=IP/04/95|0|RAPID&lg=en&display=).