



Real Academia Nacional de Medicina

Síndrome Agudo Respiratorio Severo y Gripe Aviar

**“Síndrome Agudo Respiratorio Grave
y gripe aviar”**

A cargo del Ilmo. Sr. D. José María Eirós Bouza
Instituto de Salud Carlos III



Real Academia Nacional de Farmacia

**“Aspectos epidemiológicos del SARS
y de la influenza aviar”**

A cargo del Excmo. Sr. D. Juan del Rey Calero
Real Academia Nacional de Medicina

**“Datos actuales sobre virus de la gripe de patos
salvajes y de pollos, y virus de la gripe tipo C.
Agentes antigripales”**

A cargo del Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas
Fernández del Campo
Real Academia Nacional de Farmacia



Instituto de Salud Carlos III
Ministerio de Sanidad y Consumo

Madrid, 31 de marzo de 2004.

**SÍNDROME AGUDO RESPIRATORIO GRAVE
Y GRIPE AVIAR**
***SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME AND
AVIAR FLU***

Por el Ilmo. Sr. D. JOSÉ M.^a EIROS BOUZA
Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud «Carlos III».
Ministerio de Sanidad y Consumo

Resumen

El Síndrome Agudo Respiratorio Grave (SARG) es una nueva enfermedad que ha ocasionado epidemias en algunos países en la primera mitad del año 2003, infectando a más de 8.000 personas de las cuales murieron más de 900. La enfermedad es originaria del sur de China y está causada por un nuevo Coronavirus (SARS CoV). Presentamos una revisión de la etiología, presentación clínica y diagnóstica basada en el conocimiento derivado de los estudios publicados y en la experiencia del Centro Nacional de Microbiología.

La gripe es una zoonosis. El conocimiento de la ecología de los virus gripales se ha beneficiado de la aparición de la gripe de los pájaros ocurrida en Hong Kong en 1997, considerada como potencialmente incipiente de una pandemia para humanos. El actual brote de gripe aviar del Sudeste asiático ha ocasionado un pequeño número de muertes. Estos hallazgos destacan la importancia de la vigilancia sistemática en pollos para reconocer los cambios y determinar el rango de hospedadores y su patogenicidad y como presagio de una potencial pandemia.

Abstract

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is a new disease that caused large outbreaks in several countries in the first half of 2003, resulting in infection in more than 8.000 people and more than 900 deaths. The disease originated in southern China and a novel coronavirus (SARS CoV) has been implicated as the causative organism. We present an overview of the etiology, clinical presentation and diagnosis, based on the current state of knowledge derived from published studies and our experience in the National Microbiology Centre.

Influenza is a zoonosis. This appreciation of influenza ecology facilitated recognition of the H5N1 'bird flu' incident in Hong Kong in 1997 in what was considered to be an incipient pandemic situation, the chicken being the source of virus for humans and. The current outbreak of avian influenza in South East Asia has resulted in a small number of human deaths. These findings highlight the importance of systematic virus surveillance of domestic poultry in recognizing changes in virus occurrence, host range and pathogenicity as signals at the avian level that could presage a pandemic.

INTRODUCCIÓN

La aparición del denominado síndrome agudo respiratorio grave (SARG) se inscribe dentro del marco asistencial como un cuadro de atención preferentemente multidisciplinar. Nuestra actividad como médicos dedicados al diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias particularmente desde la óptica de la virología nos anima a realizar la presente contribución.

El objetivo último al efectuar una revisión relativa a la aproximación a un paciente potencialmente infectado por un virus no difiere sustancialmente del adoptado ante cualquier persona susceptible de valoración infectológica general. En este sentido resulta de utilidad aplicar la mecánica de trabajo que contempla variables relativas al paciente, a sus antecedentes, a su síndrome clínico orientado conceptualmente hacia un determinado agente etiológico y basando su actuación en una organización secuencial en cuanto a la solicitud de exámenes complementarios y a la decisión de adoptar medidas de prevención o de iniciar quimioterapia antiinfecciosa.

Las infecciones respiratorias de etiología vírica constituyen un campo de interés para el médico por su enorme frecuencia y porque condicionan una importante morbilidad (1,2). Sin embargo la dificultad de su diagnóstico etiológico específico y el escaso arsenal de quimioterapia antivírica de que se dispone restan motivación al mismo para su estudio. En muchos textos convencionales las enfermedades infecciosas se abordan con un criterio etiológico, sin duda para mantener un orden didáctico, no obstante en la práctica asistencial los pacientes acuden con una sintomatología particular, que en muchas ocasiones es común a un gran número de agentes víricos y que pueden compartir características con otros agentes como bacterias, hongos o parásitos. En la Tabla 1 se reflejan los virus que con mayor frecuencia ocasionan patología respiratoria y se catego-

Clásicos:	Recientes:
•V. Gripales A y B	•Coronavirus
•V. Respiratorio Sincitial	•Meta neumovirus
•V. Parainfluenza 1-4	Especiales:
•Adenovirus	•CMV
•Picornavirus (Rinovirus)	•Herpes
	•Sarampión

TABLA 1.—Virus que con mayor frecuencia ocasionan patología respiratoria.

rizan en función de que su participación en la misma sea considerada como clásica, más reciente o en circunstancias especiales.

La secuencia de hechos que han conducido a la demostración del nuevo cuadro de patología infecciosa, con focalidad preferente en el árbol respiratorio denominado con el acrónimo inglés SARG, es bien conocida (3-5). La alarma se disparó el pasado mes de marzo de 2003 merced a la emisión por parte de la OMS de una alerta mundial en la que comunicaba la existencia de una epidemia de casos de neumonía atípica grave de evolución rápida y en determinadas circunstancias mortal que afectaba a determinadas áreas del Sudeste Asiático (6). A partir de aquella fecha se han producido contribuciones relevantes en el ámbito de su etiología, patogenia, manifestaciones clínicas y circunstancias epidemiológicas que serán objeto de comentario en el presente trabajo.

ETIOLOGÍA

La sucesión de estudios que apuntaron hacia un agente infeccioso como causa de SARG involucraron sucesivamente a determinadas bacterias (*Mycoplasma*, *Chlamydia*), y virus (Metapneumovirus), antes de asignar su etiología definitiva al coronavirus verdaderamente implicado en el mismo (7).

En la Tabla 2 se exponen las propiedades virológicas más destacadas de los coronavirus. Desde el punto de vista estructural, su genoma está compuesto por un único fragmento de ARN monocatenario de polaridad positiva que junto con una fosfoproteína forma el

- Virus ARNmc, no segmentado, (+)
- Simetría helicoidal, cubiertos.
- Espículas grandes, glicoproteicas, hemaglutinantes.
- Morfología esférica. Aspecto de corona solar.
- Pleomorfismo. ~100nm (60-220nm).
- Dos tipos humanos 229E y OC43.
- Huéspedes humanos y animales.

TABLA 2.—Propiedades biológicas de la familia Coronaviridae.

nucleocápside de simetría helicoidal, que a su vez está revestido por una membrana de envoltura. Esta posee diferentes espículas que conforman una amplia corona cuyos oligómeros glicoproteicos se unen a los receptores de las células huésped y facilitan la posterior fusión de la partícula viral con la membrana celular. Los coronavirus del tipo II poseen también una glicoproteína con actividad hemaglutinina-acetilasa (HE) que se une a receptores de las membranas celulares. Se postula que el gen que codifica la HE fue introducido, ancestralmente, en un coronavirus por recombinación con el ARN mensajero que codifica la hemaglutinina (H) del virus influenza C.

Morfológicamente presentan un aspecto esférico con un marcado pleomorfismo y un tamaño medio de 100 nm, que oscila entre 60 y 220 nm. La presencia de espículas en su parte más externa confieren a los viriones un aspecto de imagen en «corona» o halo solar en las imágenes de microscopía electrónica con tinción negativa, de la cual toman su denominación.

Hasta el momento actual los estudios filogenéticos apuntaban la existencia de tres grupos genéticos de coronavirus. Al igual que en otros ámbitos de la virología su similitud genética no está asociada al tropismo por determinada especie animal y ello es especialmente demostrativo al contemplar la relación genética de los dos tipos de coronavirus humanos descritos hasta la aparición del SARG: el tipo 229E y el tipo OC43, tal y como se ilustra en la Figura 1. En ella se puede observar en primer término que dentro del grupo I se incluyen los coronavirus porcinos y próximo a ellos se sitúa el coronavirus humano 229E. En segundo lugar dentro del grupo II se incluyen los coronavirus bovinos y murinos y en estrecha relación

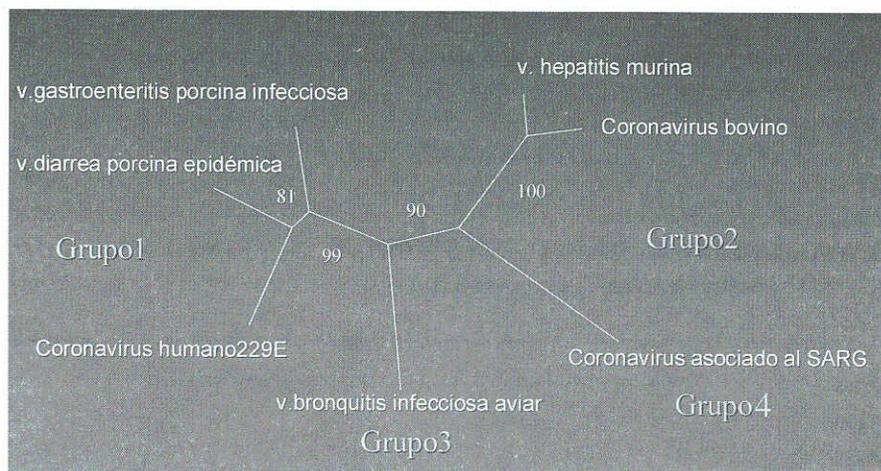


FIGURA 1.—Árbol filogenético de Coronavirus.

con estos se ubica el coronavirus humano OC43. Finalmente se representan los coronavirus del grupo III entre los que cabe citar los coronavirus de las aves, cuya especie tipo es el causante de la bronquitis infecciosa aviar. Entre los grupos genéticos II y III se incluye el recientemente descrito como coronavirus asociado al SARG. Inicialmente se postuló que el coronavirus asociado al SARG podría haber surgido como una mutación de coronavirus humanos adquiriendo nuevos factores de virulencia, como una mutación de un coronavirus animal que pudiera infectar células humanas o como una recombinación entre dos coronavirus humanos o bien uno animal y otro humano. En el momento actual el coronavirus asociado al SARG constituye un nuevo cuarto grupo monofilético dentro de la familia *Coronaviridae* (8), equidistante de los otros grupos descritos y sin evidencia de recombinación. Posteriormente los resultados de la secuenciación de diferentes aislados víricos según «clusters» epidémicos y áreas geográficas parecen apuntar la existencia de dos genotipos asociados a fuentes de transmisión (9).

La patología que ocasionan los coronavirus en animales está bien descrita en la sanidad veterinaria, donde causan zoonosis devastadoras y su importancia, como un clarividente anticipo de su trascendencia sanitaria ha sido destacada por McIntosh (10). Además de los animales ya citados (ganados porcino, bovino, aves y ratones) su gama natural de hospedadores se amplía a especies de conejos, ratas, gatos y perros, entre otros. La mayoría de los coronavirus cau-

- Bronquitis infecciosa de gallinas y aves.
- Hepatitis murina.(ML11, JHM)
- Gastroenteritis epidémica de cerdos.
- Diarrea infecciosa en perros.
- Diarrea de terneros neonatos.
- Peritonitis infecciosa felina.

TABLA 3.—Patología de Coronavirus en animales.

san patología en huéspedes de una sola especie. En la Tabla 3 se reflejan algunos de los cuadros producidos por esta familia de virus entre animales.

ASPECTOS PATOGÉNICOS

El SARG presenta un periodo de incubación variable que oscila entre 1 y 10 días, aunque en la mayoría de los casos es de 2-5 días. Afecta fundamentalmente a población adulta con edades comprendidas entre 25 y 70 años, habiéndose notificado hasta el momento muchos menos casos en población infantil.

Antes de la aparición del SARG los coronavirus descritos en humanos han sido implicados en distintos procesos patológicos que se exponen en la Tabla 4, siendo una norma frecuente la reinfecciones por el mismo subtipo y pudiendo ocurrir hasta un 50% de infecciones inaparentes.

El cuadro inicialmente se manifiesta con fiebre superior a 38° C acompañada de escalofríos, malestar general, cefalea, espasmos musculares y mialgias. En esta fase las manifestaciones respiratorias son leves o inexistentes. No suele haber afectación cutánea, ni neurológica, ni gastrointestinal, aunque en algunos casos se presenta diarrea durante la fase febril. En la Tabla 5 se exponen los hallazgos clínicos documentados en tres series diferentes (11-13). Destaca la uniformidad existente en la objetivación de fiebre y tos seca, así como la variabilidad en otro tipo de sintomatología y semiología. La limitación que impone el escaso número de pacientes inclui-

- Cuadros respiratorios
 - Resfriado común
 - Faringitis
 - Neumonía en niños <2años
 - Exacerbaciones crisis asmáticas
 - Exacerbaciones de bronquitis crónica
- Cuadros gastrointestinales
 - Gastroenteritis (infrecuente)

TABLA 4.—Procesos patológicos producidos por coronavirus humanos.

	Hsu et al ¹¹ (n=20)	Poutanen et al ¹² (n=10)	Tsang et al ¹³ (n=10)
Fiebre	100%	100%	100%
Tos seca	75%	100%	80%
Mialgias	45%	20%	50%
MEG	45%	70%	70%
Anorexia	45%	-	-
Taquipnea	40%	-	-
Náuseas, Vómitos	35%	10%	-
Dolor faríngeo	25%	30%	0%
Diarrea	25%	50%	-
Cefalea	20%	30%	70%
Disnea	-	80%	60%
Dolor torácico	-	30%	30%
Rinorrea	-	-	10%
Rigidez	-	-	90%

MEG: Malestar General.

—: No indicado en la serie.

TABLA 5.—Sintomatología y semiología referida en series clínicas de pacientes con SARG.

<ul style="list-style-type: none"> •Edad •Patología subyacente •Tabaquismo •Factores genéticos •Contacto intenso con enfermos •Coinfecciones? •Inmunidad previa?

TABLA 6.—Factores propuestos y asociados a un peor pronóstico en la evolución clínica del SARG.

dos en cada una de ellas no resta relevancia a la contribución que representan, por ser absolutamente pioneras.

Entre los 3 y los 7 días del comienzo del cuadro se instaura una fase intermedia en el curso de la enfermedad la que los enfermos presentan tos seca no productiva o disnea con o sin hipoxemia. A continuación existe una proporción que oscila entre un 10 y un 20% de los pacientes que requieren intubación y ventilación mecánica por la gravedad del cuadro. Esta parece ser proporcional a la cantidad de virus inhalada. La letalidad para casos probables y sospechosos es de alrededor del 3%. En las series señaladas no se alude de manera específica a la resolución espontánea del cuadro aunque a tenor de casuística mundial dicho evento se produce en una proporción elevada de individuos.

Durante la fase febril la radiografía de tórax suele ser normal. Posteriormente, durante la fase respiratoria, suelen aparecer infiltrados focales que evolucionan a generalizados, irregulares e intersticiales. En algunas ocasiones pueden aparecer áreas de consolidación, que en los casos graves ocasionan una afectación pulmonar masiva. Por lo que hace referencia a los hallazgos analíticos, en las fases iniciales puede aparecer linfopenia discreta. En fases posteriores hasta un 50% de los pacientes presentan leucopenia y trombocitopenia con elevación de CPK y transaminasas, con función renal conservada. En la Tabla 6 se exponen distintos factores que se han asociado a un peor pronóstico en la evolución clínica del cuadro.

Debido a que el diagnóstico precoz es primordial, desde el comienzo se ha establecido una sistemática clínica de los cuadros

<ul style="list-style-type: none"> •Caso sospechoso <ul style="list-style-type: none"> – Fiebre alta – Tos o disnea o dificultad respiratoria – Contacto con SARG – Antecedente de viaje a zonas SARG •Caso probable <ul style="list-style-type: none"> – Caso sospechoso +Rx Neumonía – o necropsia con S. de distrés respiratorio – o detección de coronavirus

TABLA 7.—Definiciones clínicas del SARG.

categorizándolos como de «sospechoso» o «probable» en función de las variables que se reflejan en la Tabla 7 (14,15). Se debe tener en cuenta que en el brote epidémico de SARG y en los casos ocurridos, el diagnóstico se ha realizado por eliminación de otras causas y etiologías en los pacientes sospechosos en razón de su procedencia geográfica o contactos anteriores.

Tal y como se puede observar en la definición de probabilidad además de los criterios clínicos y epidemiológicos expuestos en el caso sospechoso se incluyen los hallazgos anatomopatológicos de neoplasia y los virológicos de detección de coronavirus.

DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

El diagnóstico virológico y microbiológico realizados en los primeros casos permitió descartar a patógenos habituales o estacionales como virus de la gripe y otros. Sin embargo en los primeros casos se produjo un grado importante de confusión al hallar Metapneumovirus y organismos del género *Chlamydia*, en algunos de los casos, asociados en ocasiones al nuevo coronavirus, que merecerá seguramente una consideración posterior. Dado el importante potencial de difusión a humanos y ser causa de enfermedad grave el diagnóstico mediante cultivo tiene que realizarse en laboratorios de seguridad clase III o IV.

Las normas y protocolos de diagnóstico virológico aplicables a enfermos de SARG han sido objeto de una amplia difusión y da una

•Obtención de muestras separadas:

- Respiratorias altas: LNF, Frotis NF y OF (Dacrón)
- Respiratorias bajas: LBA, aspirados, pleural, esputo
- Biopsias pulmonares
- Sangre completa, suero, plasma
- Orina, Heces
- Muestras de tejidos (biópsicas o de necropsia)

LNF: Lavado NasoFaríngeo. NF: NasoFaríngeo. OF: OroFaríngeo. LBA: Lavado Broncoalveolar.

TABLA 8.—Muestras para diagnóstico virológico del SARG.

idea de ello el hecho de que en internet está disponible (16,17) información relativa al tipo de muestras y a los procedimientos de laboratorio sugeridos para su aplicación al diagnóstico etiológico de individuos presumiblemente afectados. Tal y como se expone en la Tabla 8 existen diferentes tipos de muestras a procesar cuyo rendimiento es variable en función del momento cronológico del cuadro y de la técnica de detección empleada.

La identificación mediante diagnóstico virológico directo del coronavirus asociado al SARG se consiguió en el momento inicial tanto mediante el aislamiento del virus como por su visualización mediante microscopía electrónica (ME) El nuevo coronavirus muestra un efecto citopático en la línea celular Vero E6 hacia el quinto día después de la inoculación (18). Este efecto es focal y con la apariencia birrefringente típica de las células afectadas que precede en poco tiempo a la ruptura de la monocapa celular. El posterior examen por ME de células Vero infectadas reveló las partículas características del coronavirus-SARG en las cisternas del retículo endoplasmático rugoso y en vesículas endosomales celulares. Las partículas extracelulares se encontraban formando grandes «clusters» y también adheridas a la superficie de la membrana plasmática celular. La ME de tinción negativa identificó el aspecto en corona solar ya referido atribuible a la presencia de espículas en su membrana de envoltura.

La tercera modalidad de diagnóstico directo se basa en la detección de secuencias genómicas del virus mediante amplificación ba-

sada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ha sido posible merced a la secuenciación completa (19,20). Las técnicas de amplificación genómica basadas en el uso de la RT-PCR han supuesto la aproximación al diagnóstico más factible. Sin embargo los mejores resultados parecen obtenerse con el uso combinado de heces y muestras respiratorias ya que en aquellas el porcentaje de muestras positivas es notablemente superior al de muestras respiratorias, aspecto especialmente significativo en los primeros días del comienzo de los síntomas.

En este sentido los estudios serológicos realizados han demostrado la presencia de anticuerpos frente al nuevo coronavirus en muestras séricas obtenidas durante la convalecencia de pacientes con SARG. Sin embargo dichos anticuerpos no se han observado en sueros humanos congelados de épocas anteriores al brote del nuevo síndrome de neumonía asiática; lo cual sugiere que el coronavirus asociado al SARG es inédito en la población humana, y apoya la hipótesis de que se trate de una especie de virus de introducción muy reciente en huéspedes humanos. Las contribuciones más recientes apuntan en esta última dirección ya que se ha podido demostrar la presencia del nuevo coronavirus en la civeta y algunos mamíferos comunes y utilizados como parte de la dieta alimenticia de ciertas regiones asiáticas, extremos que precisan ser confirmados.

En la Tabla 9 se resumen las diferentes estrategias de diagnóstico virológico disponibles en el momento actual en el Centro Nacional de Microbiología.

- | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - Visualización por Microscopía Electrónica <ul style="list-style-type: none"> • Tinción Negativa • Transmisión - Aislamiento en cultivos celulares <ul style="list-style-type: none"> • Vero E6 - Detección de ácido nucleico <ul style="list-style-type: none"> • PCR específica • «Multiplex» para virus respiratorios - Determinación de Ac específicos en suero |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

TABLA 9.—Estrategias de diagnóstico virológico utilizadas para el coronavirus implicado en el SARG.

ORTHOMYXOVIRUS

MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA

Los virus gripales se incluyen en la familia *Orthomyxoviridae*, que en la actualidad agrupa tres géneros (21). Todos ellos son virus con ARN monocatenario, de tamaño medio, simetría helicoidal y provistos de una membrana de envoltura. La denominación de «myxovirus» se relaciona con su afinidad por la mucina, mucoproteína existente en el moco de diversas secreciones, en algunos receptores epiteliales, en la membrana de los hematíes y en el suero (22).

Los virus gripales A y B (virus influenza A y B) constituyen el género más importante. El virus gripal C constituye un segundo género, con escaso interés en patología humana y difiere en determinadas características del género anterior. El tercer género es de descripción más reciente, se ha denominado «Virus Togoto-like», con un interés también reducido en el ámbito clínico (23).

En la Tabla 10 se exponen las características más relevantes de los virus gripales A y B. Los viriones poseen una forma esférica o filamentosa y en su interior albergan un nucleocápside que contiene ocho fragmentos de ARN monocatenario, una nucleoproteína y el complejo ARN-polimerasa. En el exterior de este nucleocápside y por debajo de la membrana de envoltura se sitúan la proteína matriz (M1), que confiere estabilidad a la partícula vírica y la proteína M2 (24).

Tipos	Dos. Definidos por la nucleoproteína: virus gripal A y virus gripal B
Subtipos	Diversos en el virus gripal A. Definidos por las glucoproteínas de superficie
Acido nucleico	ARN monocatenario de polaridad negativa
Simetría	Helicoidal
Envoltura	Lipídica con proyecciones glucoproteicas
Forma del virión	Esférica o filamentosa
Diámetro del virión	80-120 nm
Genoma	8 segmentos de ARN
Proyecciones glucoproteicas	Hemaglutinina (H) y Neuraminidasa (N)

TABLA 10.—Principales características de los virus gripales A y B.

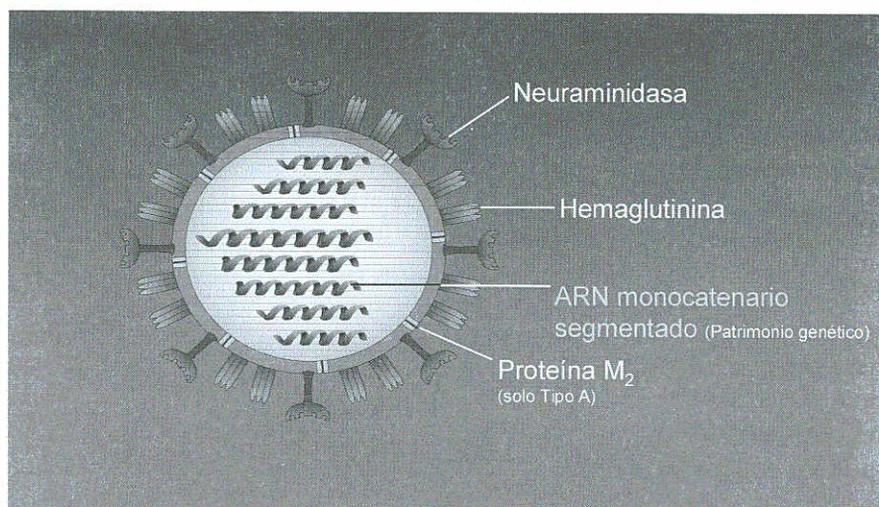


FIGURA 2.—Estructura de los virus gripales.

En la parte más externa se sitúa la membrana de envoltura, que procede de la membrana citoplasmática de la célula huésped y es de naturaleza lipídica. En ella asientan glucoproteínas de origen vírico, dispuestas a modo de proyecciones denominadas hemaglutinina y neuraminidasa (Figura 2).

El componente glucoproteico más importante es la hemaglutinina (H), que constituye en torno al 25% de las proteínas víricas (25). Cada virión presenta alrededor de un millar de proyecciones, dispuestas a modo de espículas superficiales, formadas cada una por un trímero de tres subunidades idénticas, que en conjunto poseen un peso molecular de 250 kD. Entre sus funciones biológicas cabe destacar que es responsable tanto de la fijación del virus a los receptores mucoproteicos de las células del epitelio respiratorio (que contienen ácido N-acetil-neuramínico) como de la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular.

La neuraminidasa (N) representa alrededor del 5% de las proteínas totales del virión, el cual presenta del orden de 200 moléculas de la misma. Estas están constituidas por cuatro subunidades idénticas que forman un tetrámero de 240 kD (26). Su actividad funcional se caracteriza por ser una N-acetilneuraminilhidrolasa (sialidasa), provocando la liberación del ácido N-acetilneuramínico, constituyente de todas las mucinas. Por ello colabora con la H en los procesos de fu-

- Las variaciones menores o deslizamientos antigénicos («antigenic drift») que afectan sobretodo a la H y suponen la aparición de una nueva cepa o variante frente a la cual la población tiene sólo una inmunidad parcial por exposiciones anteriores a las cepas originarias. Con el cambio gradual de los antígenos superficiales surge una serie de nuevas variantes, cada una diferente de su predecesora y más alejada del subtipo inicial, pero conservándose éste. Los casos de gripe que se presentan en las estaciones frías y primavera, en forma esporádica o en brotes epidémicos más o menos extensos, están producidos por las variantes menores (33).

- Las variantes mayores o sustituciones antigénicas («antigenic shift») implican el cambio total del antígeno H, del antígeno N o de ambos. Suponen la aparición de un subtipo diferente del difundido hasta entonces en la población, frente al cual ésta carece totalmente de experiencia inmunológica y, por consiguiente, de inmunidad. Las pandemias gripales ocurren generalmente como consecuencia de la aparición de un nuevo subtipo del virus gripal A por una variación mayor (34).

DENOMINACIÓN

Los virus gripales se clasifican por sus antígenos profundos, fundamentalmente la nucleoproteína, en dos tipos antigénicos, A y B. El tipo A se subdivide en subtipos por sus antígenos superficiales (H y N), y cada subtipo incluye un número ilimitado de variantes definidas por las características propias de los antígenos superficiales de una cepa determinada.

Tipo antigénico: A o B
Origen geográfico
Número de la cepa en el laboratorio de origen
Año de aislamiento
Fórmula de sus antígenos superficiales: subtipo H y subtipo N

TABLA 11.—Características sobre las que asienta la denominación de los virus gripales.

La denominación de los virus aislados (28) se establece consignando las características que se citan en la Tabla 11.

EPIDEMIOLOGÍA

Los virus gripales A y B constituyen el género más importante de Orthomyxovirus y son los causantes fundamentales del síndrome gripal, implicándose en menor medida el influenzavirus tipo C. Todos ellos producen infecciones respiratorias que provocan una repercusión sistémica importante (35).

Los virus gripales A están ampliamente difundidos en la naturaleza en diferentes especies animales. El estudio de su ecología resulta fundamental para el conocimiento de la historia natural de la gripe A (35,36). Diversos mamíferos sufren epizootias importantes, en particular los cerdos, caballos (37) y mamíferos marinos (focas, ballenas), y de forma esporádica perros, gatos, bóvidos y monos; también se han descrito casos en murciélagos, visones y renos verosíblemente al entrar en el ciclo ecológico de las aves salvajes. Las aves salvajes, y en particular los patos y otras especies migratorias afines, constituyen el reservorio central de la gripe A. Pero más que un reservorio en el sentido epidemiológico clásico representan un depósito natural de un amplio *pool* de genes; un reservorio genético en el que existen frecuentes ocasiones para la recombinación genética, la diseminación por vía fecal y la difusión de los virus por todo el mundo (38). Las

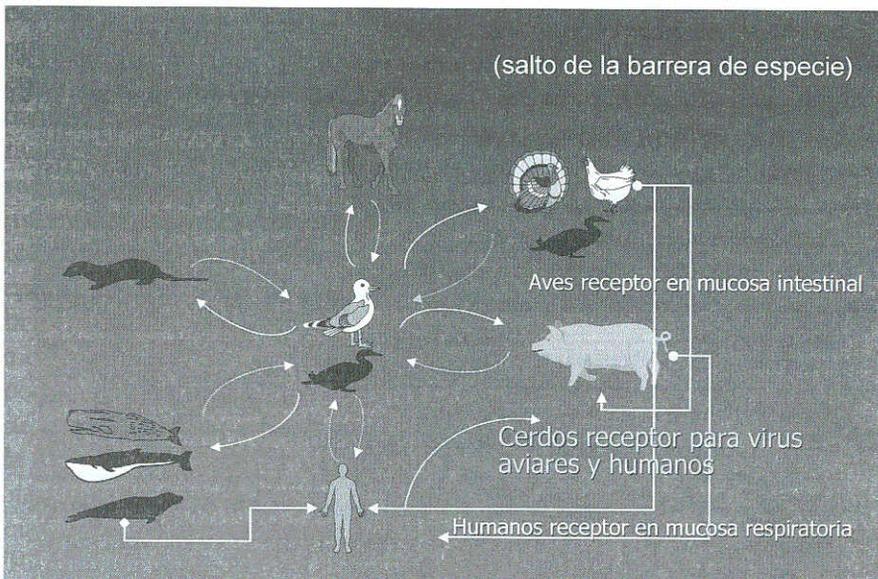


FIGURA 4.—Transmisión interespecie de los virus gripales A.

aves domésticas constituyen un reservorio secundario relacionado con el anterior. Entre los mamíferos, el ganado porcino ocupa un lugar destacado por la posibilidad de persistencia de determinados subtipos y por constituir un probable eslabón para la infección humana. La transmisión interespecies de los virus gripales A es un hecho comprobado (Figura 4), pero la especificidad de especie es importante. Son raros los casos de infección humana con un virus de origen animal bien documentado (39).

La única fuente de infección es el hombre enfermo o portador de formas paucisintomáticas. La transmisión ocurre siempre por mecanismo aéreo directo, como resulta obligado por la fragilidad del virus en el medio externo. Los fenómenos de agregación, más frecuentes en los meses fríos y en las instituciones cerradas, favorecen la difusión de los virus gripales, cuya transmisibilidad es una de las más importantes entre todas las infecciones humanas. Toda la población es susceptible; la única limitación se debe a la existencia de inmunidad por contactos previos con virus idénticos o antigénicamente próximos (40). La gripe se presenta en forma de brotes epidémicos más o menos importantes, habitualmente todos los años y durante los meses fríos, como consecuencia de las variaciones menores de los virus A y B. Las epidemias progresan en la población a través de los grupos familiares y en las instituciones cerradas (guarderías, colegios, residencias de ancianos, cuarteles, etc.) y pueden afectar a la mayoría de las personas (41).

La gripe A puede, además, ocasionar pandemias como consecuencia de la aparición de variantes mayores frente a las que la población carece absolutamente de inmunidad. Se presentan varias ondas epidémicas, que no ocurren necesariamente en los meses fríos, y afectan en pocos meses a todo el mundo.

Desde el punto de vista de la salud pública su importancia reside tanto en la elevada mortalidad que origina en las poblaciones, como en la mortalidad que puede ocasionar, tanto de forma directa como por agravamiento de otras enfermedades de base, sobre todo de naturaleza crónica cardiorrespiratoria en grupos denominados de riesgo (42). Por último, origina importantes costes sociales y sanitarios, derivados del absentismo laboral que provoca y merced a los gastos que ocasiona su asistencia.

VIGILANCIA Y DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

La vigilancia epidemiológica en la gripe tiene un doble objetivo: por una parte, conocer con prontitud las características epidemiológicas y clínicas de la actividad gripal en la población y, por otra, obtener aislamientos representativos de los virus circulantes para su análisis antigénico; ambos fines sirven como mecanismo de alerta para la toma de las decisiones pertinentes.

Existen diferentes sistemas de vigilancia que varían de unos países a otros en función de su sistema sanitario (43). La vigilancia puede utilizar múltiples indicadores de variada sensibilidad y especificidad y de diversos orígenes. Los datos de morbilidad, clínicos y epidemiológicos, se obtienen de la declaración de casos de gripe y, eventualmente, de infección respiratoria aguda y neumonía. Otro indicador de gran utilidad es el análisis de la mortalidad por gripe y neumonía (44). También pueden monitorizarse otros datos médicos, como hospitalizaciones, número de consultas, consultas de urgencias y consumo de medicación antigripal. Los datos indirectos no médicos más útiles son los de absentismo laboral y escolar. En cualquier caso, una adecuada vigilancia exige la combinación de varios indicadores (45).

El estudio de la morbilidad se basa en algunos países en la información generada por los médicos generales, pediatras y servicios de salud que informan semanalmente de la actividad gripal (46); en otros, se atiende más a la información recogida por redes de médicos centinelas sobre los casos de gripe e infección respiratoria aguda registrados en la población que atienden (47). La información facilitada por la red de vigilancia puede ser recogida y difundida por métodos convencionales o por vía telemática (48,49), que tiene, además de su rapidez, la indudable ventaja de una adecuada retroinformación de los servicios de la red. Es fundamental que los datos epidemiológicos se correlacionen con la adecuada información sobre los virus causales circulantes en la población (50). La información obtenida con los diversos sistemas puede completarse con el control particularizado de algunas instituciones cerradas (residencias de ancianos, guarderías) y determinados grupos de población, como la militar y la laboral en distintas empresas.

En la actualidad disponen de programas específicos de vigilancia de la gripe la mayoría de los países occidentales como Francia (47,51,52), Gran Bretaña (53), Alemania (54), Bélgica (55), Holanda (56) y Estados Unidos (57) y se promociona la comunicación entre

VIGILANCIA Y DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

La vigilancia epidemiológica en la gripe tiene un doble objetivo: por una parte, conocer con prontitud las características epidemiológicas y clínicas de la actividad gripal en la población y, por otra, obtener aislamientos representativos de los virus circulantes para su análisis antigénico; ambos fines sirven como mecanismo de alerta para la toma de las decisiones pertinentes.

Existen diferentes sistemas de vigilancia que varían de unos países a otros en función de su sistema sanitario (43). La vigilancia puede utilizar múltiples indicadores de variada sensibilidad y especificidad y de diversos orígenes. Los datos de morbilidad, clínicos y epidemiológicos, se obtienen de la declaración de casos de gripe y, eventualmente, de infección respiratoria aguda y neumonía. Otro indicador de gran utilidad es el análisis de la mortalidad por gripe y neumonía (44). También pueden monitorizarse otros datos médicos, como hospitalizaciones, número de consultas, consultas de urgencias y consumo de medicación antigripal. Los datos indirectos no médicos más útiles son los de absentismo laboral y escolar. En cualquier caso, una adecuada vigilancia exige la combinación de varios indicadores (45).

El estudio de la morbilidad se basa en algunos países en la información generada por los médicos generales, pediatras y servicios de salud que informan semanalmente de la actividad gripal (46); en otros, se atiende más a la información recogida por redes de médicos centinelas sobre los casos de gripe e infección respiratoria aguda registrados en la población que atienden (47). La información facilitada por la red de vigilancia puede ser recogida y difundida por métodos convencionales o por vía telemática (48,49), que tiene, además de su rapidez, la indudable ventaja de una adecuada retroinformación de los servicios de la red. Es fundamental que los datos epidemiológicos se correlacionen con la adecuada información sobre los virus causales circulantes en la población (50). La información obtenida con los diversos sistemas puede completarse con el control particularizado de algunas instituciones cerradas (residencias de ancianos, guarderías) y determinados grupos de población, como la militar y la laboral en distintas empresas.

En la actualidad disponen de programas específicos de vigilancia de la gripe la mayoría de los países occidentales como Francia (47,51,52), Gran Bretaña (53), Alemania (54), Bélgica (55), Holanda (56) y Estados Unidos (57) y se promociona la comunicación entre

- | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Recogida y análisis de información epidemiológica 2. Diagnóstico etiológico de los casos 3. Aislamiento y caracterización de los virus causales 4. Realización de estudios seroepidemiológicos sobre inmunidad de la población frente a las diferentes variantes y subtipos 5. Apoyo a la investigación sobre los virus gripales humanos y animales, la enfermedad gripal y la vacunación antigripal 6. Recomendaciones sobre la composición de la vacuna |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

TABLA 12.—Algunos objetivos del Programa Internacional de Vigilancia de la Gripe (PIVG) de la OMS.

las redes de los diversos países europeos (58). En España existe también una amplia experiencia en la vigilancia de la gripe, y en el momento actual existen programas específicos para la vigilancia en diversas Comunidades Autónomas, entre ellas Cataluña (59), Castilla y León (60) y la Comunidad de Madrid (61). Además desde la temporada 1993-1994 se ha puesto en marcha una coordinación de la información facilitada por los laboratorios de diversos centros con capacidad de aislamiento de virus gripales para su difusión a través del Centro Nacional de Epidemiología.

La gripe tiene evidentemente una importancia supranacional. Por ello ha merecido especial atención por la OMS, que en 1954 estableció un Programa Internacional de Vigilancia de la Gripe (PIVG) (62) que, cada vez más perfeccionado, continúa en la actualidad. Algunos de cuyos objetivos se reflejan en la Tabla 12.

Las estrategias de diagnóstico virológico se exponen en la Tabla 13 y se ajustan básicamente a lo referido para el Coronavirus del SARG.

- | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - Aislamiento <ul style="list-style-type: none"> • Embrión de pollo • Líneas celulares: MDCK - Tipado y Subtipado <ul style="list-style-type: none"> • Identificación de variantes por RIH - Detección de ácido nucleico <ul style="list-style-type: none"> • PCR específica • «Multiplex» para virus respiratorios - Caracterización y secuenciación - Determinación de Ac en suero |
| <p>RIH: reacción de inhibición de la hemaglutinación.</p> |

TABLA 13.—Estrategias de diagnóstico virológico de la Gripe.

GRIPE AVIAR

En el presente año 2004, se ha suscitado de nuevo una importante alarma en la población ante la explosiva presentación y difusión de la gripe aviar en diversos países del sudeste asiático y la aparición de casos muy severos en personas en contacto con las aves infectadas (63). Las informaciones facilitadas precozmente por la OMS, han sido recogidas y difundidas por las autoridades sanitarias de todos los países.

El espectro de huéspedes y la patogenia de los virus gripales A derivan del conjunto de todos los segmentos génicos (Figura 5). El segmento más importante para la patogenia es la H (64,65), pero la constelación génica final es muy importante. Para infectar a un nuevo huésped, es preciso una adaptación progresiva y la presentación de un fenotipo aviar o de mamífero está bien estudiado. En relación con la H, glicoproteína que ejerce las funciones más importantes para la infectividad, este segmento proporciona los receptores para la unión a las células aviarias y a los mamíferos, la fusión de membranas y establece las condiciones para su clivado en H1 y H2. Además, la H presenta sus epitopos responsables de su antigenicidad (Figura 6). Es extremadamente importante identificar los cambios mínimos necesarios que permitirían replicarse al virus gripal aviar y transmitirse eficientemente en el hombre.

TIPO H	Huéspedes	TIPO N	Huéspedes
H1	Hombre, Cerdo 	N1	Hombre, Cerdo 
H2	Hombre	N2	Hombre, Cerdo 
H3	Hombre, Cerdo 	N3	
H4		N4	
H5	Hombre *	N5	
H6		N6	
H7	 Hombre *	N7	Hombre * 
H8		N8	
H9	Hombre *	N9	
H10-15			

* Sin transmisión interhumana

FIGURA 5.—Ecología antigénica del virus gripal A.

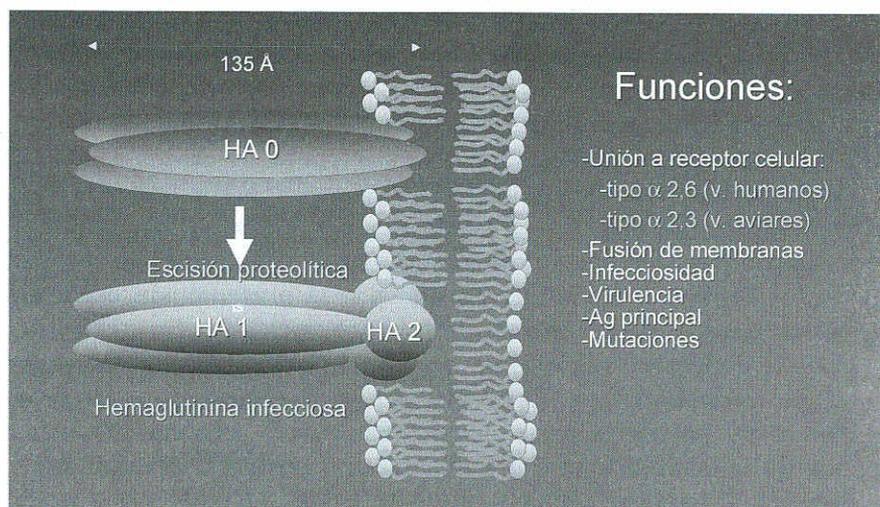


FIGURA 6.—Hemaglutinina del virus de la gripe.

Las cepas aviares presentan habitualmente una virulencia baja (baja patogenicidad de la gripe aviar, BPGA). Pero desde los años 60 se describieron cepas de alta patogenicidad (APGA), con una gran virulencia en granjas avícolas (en su mayoría, gallinas, pollos y pavos). Desde 1959 al momento actual se han contabilizado 23 epizootias incluyendo el episodio del sureste asiático del 2004 y el actual brote aparecido en Canadá (abril 2004). Las cepas aviares de alta virulencia presentan las hemaglutininas H5 o H7 que presentan algunas características en su glicoproteína por mutación.

Las hemaglutininas (Hs) de las cepas con H5 y H7 desempeñan el papel central de la alta virulencia de la gripe aviar en las aves domésticas. Su H es clivada sin necesidad de proteasa exógena. Las hemaglutininas de estos subtipos poseen múltiples aminoácidos básicos al final de la H1, que permite el clivado por proteasas celulares. En las cepas de alta patogenicidad sus Hs al ser clivadas permiten la generación de mutantes de inserción (66). Los receptores específicos de la gripe aviar se unen de preferencia a sialiloligosacáridos celulares terminados con enlaces SA \pm 2,3 galactosa, mientras que los virus humanos, en particular los H3, se unen a enlaces SA \pm 2,6. Los hallazgos recientes sugieren claramente que la H de 1918 interactuaba con los receptores humanos (67,68).

Las epizootias producidas por virus de alta patogenicidad no mostraron hasta el 1997 capacidad para infectar a los seres huma-

nos seriamente. Desde los episodios de 1997 y 2004 algunos virus aviares han traspasado la barrera entre especies en forma limitada pero con alta gravedad.

Las epidemias producidas por virus APGAs han tenido importantes repercusiones sociales, económicas y comerciales, en particular en los brotes de Pensylvania (H5N2), Méjico (H5N2) e Italia (H7N1). En algunos episodios, los virus de alta virulencia se han mantenido, incluso despues del sacrificio y reposición, durante varios años. En otros brotes, se ha vuelto de nuevo a la presentación esporádica de infecciones por cepas de baja patogenicidad.

Desde diciembre de 2003 al año 2004, los acontecimientos por la gripe aviar han sido sorprendentes y alarmantes por diversos motivos. En primer término por su distribución amplia con nueve países de la zona (Corea del Sur, Japón, Vietnam, Tailandia, Laos, Indonesia, Camboya, China y Taiwan). Todas las epidemias avícolas fueron producidas por virus gripal H5N1. Las epizootias en Pakistán fueron producidas por otros subtipos (H7, H9) y también el brote actual en Columbia Británica en Canadá (H7).

En segundo lugar, la velocidad de propagación en tres meses ha sido espectacular. El número de granjas avícolas afectadas ha sido enorme en todos los países implicados y las aves sometidas al sacrificio (la única medida eficaz inicialmente) se cuentan en centenas de millones.

En tercera instancia se ha documentdo su transmisión al ser humano por contacto o inhalación, con una gravedad extrema. Si el incidente de Hong Kong en 1997 supuso una mortalidad humana del 35%, en los dos países que han declarado casos humanos (Vietnam y Tailandia) en 2004 la mortalidad ha alcanzado al 70%.

Tras los esfuerzos de la OMS y sus expertos y de las autoridades sanitarias de los países afectados, se asiste ahora un periodo de cierta calma. Se ha demostrado de nuevo, como ocurrió en 1997 en Hong Kong, que el sacrificio interrumpe la propagación, por lo menos temporalmente.

Dado que el virus responsable es el A (H5N1) es necesario precisar que las cepas, desde la de 1997 hasta las más recientes de origen humano, son muy heterogéneas, y que resulta difícil encontrar un candidato apropiado para una vacuna frente a una pandemia H5 (69).

De manera concomitante y por lo que atañe al diagnóstico virológico, es válido lo reseñado para los virus gripales convencionales si bien la manipulación y manejo de virus altamente patógenos (H5,

H7), como había sido acertadamente señalado por prestigiosos especialistas en nuestro medio, debe hacerse en laboratorios de seguridad de clase III (70).

BIBLIOGRAFÍA

1. HAMRE, D.; CONNELLY A.P.; PROCKNOW, J.J.: «Virologic studies of acute respiratory disease in young adults: IV. Virus isolations during four years of surveillance». *Am J Epidemiol* 1966; 83: 238-243.
2. EVANS, A.S., ed.: *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. 3rd ed. Nueva York, Plenum, 1989.
3. CHRISTIAN, M.D.; POUTANEM, S.M.; LOUTFY, M.R.; MULLER, M.P.; LOW, D.E.: «Severe acute respiratory syndrome». *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1420-1427.
4. ENSERIK, M.: «Infectious Diseases: One Year after Outbreak, SARS virus yields some secrets». *Science* 2004; 304: 1097.
5. SALLERAS, L.: «Síndrome respiratorio agudo grave. Una nueva enfermedad infecciosa emergente». *Med Clin (Barc.)* 2003; 120: 619-621.
6. ZAPP, R.; KRAJEN, M.; LYNCHM T.: «SARS: a quality management test for our public health safety net». *Qual Manag Health Care* 2004; 13: 120-129.
7. HOLMES, K.V.: «SARS-Associated Coronavirus». *N Engl J Med* 2003; 348: 1948-1951.
8. PALTRINIERI, S.: «Human severe acute respiratory syndrome (SARS) and feline coronaviruses». *J Feline Med Surg* 2004; 6: 131-132.
9. ZHU, G.; CHEN, H.W.: «Monophyletic relationship between severe acute respiratory syndrome coronavirus and group 2 coronaviruses». *J Infect Dis* 2004; 189: 1676-1678.
10. MCINTOSH: *Coronaviruses*. En: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R., eds. MANDELL, DOUGLAS and BENNETTS: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th ed. Nueva York, Churchill Livingstone, 2000: 1767-1770.
11. HSULY; LEE, C.C.; GREEN, J.A.; ANG, B.; PATON, N.I.; LEE, L. *et al.*: «Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) in Singapore: Clinical Features of Index Patient and Initial Contacts». *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9: 713-717.
12. POUTANEN, S.M.; LOW, D.E.; HENRY, B.; FINKELSTEIN, S.; ROSE, D.; GREEN, K. *et al.*: «Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome in Canada». *The New England Journal of Medicine*, 2003, 348: 1995-2005.
13. TSANG, K.W.; HO, P.L.; OOI, G.C.; YEE, W.K.; WANG, T.; CHAN-YEUNG, M. *et al.*: «A cluster of severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong». *New England Journal of Medicine*, 2003, 348: 1977-1985.
14. PUMAROLA, T.; DOMÍNGUEZ, A.: «Síndrome respiratorio agudo grave». *Med Clin (Barc.)* 2003; 120: 626-629.
15. Preliminary Clinical Description of Severe Acute Respiratory Syndrome. <http://who.int/csr/sars/clinical/en/>
16. http://www.who.int/csr/sars/archive/2003_03_12
17. <http://www.who.int/csr/sars/management/en>
18. GOLDSMITH, C.S.; TATTI, K.M.; KSIAZEK, T.G.; ROLLIN, P.E.; COMER, J.A.; LEE, W.W. *et al.*: «Ultrastructural characterization of SARS coronavirus». *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 320-326.

19. EMERY, S.L.; ERDMAN, D.D.; BOWEN, M.D.; NEWTON, B.R.; WINCHELL, J.M.; MEYER, R.F. *et al.*: «Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus». *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 311-316.
20. WU, H.S.; CHIU, S.C.; TSENG, T.C.; LIN, S.F.; LIN, J.H.; HSU, Y.H. *et al.*: «Serologic and molecular biologic methods for SARS-associated coronavirus infection, Taiwan». *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 304-310.
21. MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L. *et al.*, eds.: «Virus taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Family orthomyxoviridae». *Arch Virol* 1995; (suppl 10): 293-299.
22. MURPHY, B.R.; WESTER, R.G.: *Orthomyxoviruses*. En: Fields, B.N.; Knippen, D.M.; Howley, P.M., eds.: *Virology*, 3ª ed. Nueva York: Lippincott-Raven; 1996. Vol. 1, p. 1397-1445.
23. LAMB, R.A.; KRUG, R.M.: *Orthomyxoviridae. The virus and their replication*. En: Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M., eds.: *Virology*, 3ª ed. Nueva York: Lippincott-Raven; 1996. Vol. 1, pp. 1353-1395.
24. ZIEGLER, T.; COX, N.J.: *Influenza viruses*. En: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, F.C.; Yolken, R.H., eds.: *Manual of Clinical Microbiology*, 6ª ed. Washington: ASM Press; 1995, pp. 918-925.
25. LAVER, W.G.: «The hemagglutinin of influenzaviruses: Structure, immunology and biological function». *J Infect Dis* 1978; 138: 105-109.
26. COLACINO, J.M.; CHIRGADZE, N.Y.; GARMAN, E.; MURTI, K.G.; LONCHARICH, R.J., BAXTER, A.J. *et al.*: «A single sequence change destabilizes the influenza virus neuraminidase tetramer». *Virology* 1997; 236: 66-75.
27. MORRIS, S.J.; PRICE, E.G.; BARNETT, J.M.; HISCOX, S.A.; SMITH, H.; SWEET, C.: «Role of neuraminidase in influenza virus-induced apoptosis». *J Gen Virol* 1999; 80: 137-146.
28. WHO memorandum. A revision of the system of nomenclature for influenza virus. *Bull WHO* 1980; 58: 585-591.
29. AIR, G.M.; LAVER, W.G.: «The neuraminidase of influenza virus». *Proteins Struct Funct Genet* 1989; 6: 341-356.
30. RÖHM, C.; ZHOU, N.; SÜSS, J.; MACKENZIE, J.; WEBSTER, R.G.: «Characterization of a novel influenza hemagglutinin H15: criteria for determination of influenza subtypes». *Virology* 1996; 217: 508-516.
31. AYMARD, M.; COLEMAN, M.T.; DOWDLE, W.R.; LAVER, W.G.; SCHILD, G.C.; WEBSTER, R.G.: «Influenza virus neuraminidase inhibition test procedures». *Bull WHO* 1973; 48: 199-202.
32. LAVER, W.G.; AIR, G.M., eds.: *Structure and variation in influenza virus*. Nueva York: Elsevier North Holland; 1980.
33. HARMON, M.W.: *Influenza viruses*. En: LENNETTE, E.H., ed.: *Laboratory diagnosis of viral infections*, 2ª ed. Nueva York: Marcel Dekker; 1992. pp. 515-534.
34. WEBSTER, R.G.; BEAN, W.J.; GORMAN, O.T.; CHAMBERS, T.M., KANAOKA, Y.: «Evolution and ecology of influenza A viruses». *Microbiol Rev* 1992; 56: 152-159.
35. RODRÍGUEZ OTERO, J.: *Gripe y otras viriasis respiratorias*. En: Rodés Teixidor, J.; Guardia Massó, J., dirs.: *Medicina Interna*. Masson. Barcelona Tomo I, 1997: 1904-1913.
36. WEBSTER, R.G.; BEAN, W.J.; GORMAN, O.T.; KAWAOKA, Y.: «Evolution and ecology of influenza A viruses». *Microbiol Rev* 1992; 56: 152-179.

37. PRONTKOWSKI, M.D.: «Questions validity of equine vaccine field studies». *J Am Vet Med Assoc* 1999; 215 (5): 620-621.
38. OLSEN, C.W.; CAREY, S.; HINSHAW, L.; KARASIN, A.I.: «Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States». *Arch Virol* 2000; 145: 1399-1419.
39. SNACKEN, R.: «Control of influenza. Public Health Policies». *Vaccine* 1999; 17 (Suppl 3): S61-S63.
40. BELSHE, R.B.: «Influenza prevention and treatment: current practices and new horizons». *Ann Intern Med* 1999; 131: 621-624.
41. DE WALS, P.; DOUVILLE-FRADET, M.; COUILLARD, M.; BOLDOC, D.; MAZIARDE, J.; PARE, L. *et al.*: «Influenza surveillance and dissemination of information to health professionals and the general public in the province of Quebec». *Can Commun Dis Resp* 2000; 26: 1-5, 8.
42. RODRÍGUEZ TORRES, A.; CASTRODEZA, J.; ORTIZ DE LEJARAZU, R.: *Vacuna antigripal*. En: Salleras Sanmartí, L.L., ed.: *Vacunaciones preventivas. Principios y Aplicaciones*. Masson. Barcelona 1998: 229-257.
43. CANAS, L.C.; LOHMAN, K.; PAVLIN, J.A.; ENDY, T.; SINGH, D.L.; PANDEY, P. *et al.*: «The Department of Defense laboratory-based global influenza surveillance system». *Mil Med* 2000; 165 (suppl 2): 52-56.
44. CHOI, K.; THACKER, S.B.: «An evaluation of influenza mortality surveillance 1962-1979. I. Time series forecasts of expected pneumonia and influenza deaths». *Am J Epidemiol* 1981; 113: 215-226.
45. WORLD HEALTH ORGANIZATION: «Surveillance of influenza in the European region». *Wkly Epidemiol Rec* 1992; 67: 49-50.
46. LA FORCE, M.F.; NICHOL, K.L.; COX, N.J.: «Influenza: Virology, epidemiology disease and prevention». *Am J Prev Med* 1994; 10 (suppl): 31-44.
47. HANNOUN, C.; DAD, W.; COHEN, J.M.: «A new influenza surveillance system in France: The Ile-de-France "Grog" I. Principles and methodology». *Eur J Epidemiol* 1989; 5: 285-293.
48. CHAUVIN, P.: «Constitution and monitoring of an epidemiological surveillance network with sentinel general practitioners». *Eur J Epidemiol* 1994; 10: 477-479.
49. FRIEDE, A.; REID, J.A.; ORY, H.W.: «CDC Wonder: A comprehensive online public health information system of the Center for Disease Control and Prevention». *Am J Public Health* 1993; 83: 1289-1294.
50. ORTIZ DE LEJARAZU, R.; RODRÍGUEZ TORRES, A.; BELTRÁN, M.: *Resultados de la vigilancia de la gripe en Valladolid desde 1972 a 1984. Aspectos actuales en biología y medicina. Libro homenaje al Prof. A. Pumarola*. Valladolid: Sever Cuesta. 1984: 453-458.
51. VALLERON, A.J.; GARNERIN, P.: «Computer networking as a tool for public health surveillance: The French experiment». *MMWR* 1992; 41 (suppl): 101-110.
52. AYMARD, M.; VALETTE, M.; LINA, B.; THOUVENOT, D.: «Surveillance and impact of influenza in Europe. Groupe Regional d'Observation de la Grippe and European Influenza Surveillance Scheme». *Vaccine* 1999; 17 (suppl 1): 40-41.
53. CHAKRAVERTY, P.: «Surveillance of influenza in the United Kingdom». *Eur J Epidemiol* 1994; 10: 493-495.

54. SZECSENYI, J.; UPHOFF, S.; LEY, S.; BREDE, H.D.: «Influenza surveillance: Experiences from establishing a sentinel surveillance system in Germany». *J Epidemiol Community Health* 1995; 49 (suppl 1): 9-13.
55. SNACKEN, R.; CAPET, F.; STROOBANT, A.: «Usage du vidéotex en santé publique». *Tech Sante* 1993; 14: 47-50.
56. SPRENGER, M.J.W.; KEMPEN, B.M.; HANNOUN, C.; MASUREL, N.: «Electronic influenza surveillance». *Lancet* 1992; 339: 874.
57. BRAMMER, T.L.; IZURIETA, H.S.; FUKUDA, K.; SCHMELTZ, L.M.; REGNERY, H.L.; HALL, H.E. *et al.*: «Surveillance for influenza-United States, 1994-95, 1995-96, and 1996-97 seasons». *Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ* 2000; 49: 13-28.
58. SNACKEN, R.; BENSANDON, M.; STRAUSS, A.: «The CARE telematics network for the surveillance of influenza in Europe». *Methods Inf Med* 1995; 34: 518-522.
59. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Activitat gripal a l'Àrea de Barcelona. Temporada 1995-1996. *Bulletí Epidemiològic de Catalunya*, 1996; XVI: 85-90.
60. Consejería de Cultura y Bienestar Social. Subprograma de Control de la gripe. Boletín Epidemiológico de Castilla y León, 1987; 3: 163-170.
61. ORDOBÁS, M.A.; ZORRILLA, B.; ARIASA P.: «Influenza in Madrid, Spain. 1991-92: Validity of the sentinel network». *J Epidemiol Community health* 1995; 49 (suppl 1): 14-16.
62. KAPLAN, M.M.: «The role of World Health Organization in the study of influenza». *Philos Trans R Soc Lon Biol* 1980; 288: 417-421.
63. ANÓNIMO: «Avian influenza (H5N1)». *WHO Weekly Epidemiol Rec*, 2004; 79: 96-99.
64. STEINHAEUER, D.A.: «Role of hemmagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus». *Virology* 1999; 258: 1-20.
65. WEBSTER, R.G.; ROTT, R.: «Influenza virus A pathogenicity: The pivotal role of hemmagglutinin». *Cell* 1987; 50: 665-666.
66. WRIGHT, P.F.; WEBSTER, R.G.: *Orthomyxoviruses*. En: Knipe, D.M.; Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*, Vol. 1, 4th ed. 1533-1579. Lippincott Williams Philadelphia 2001.
67. GAMBLIN, S.J.; HAIRE, L.F.; RUSSEL, R.J.; STEVENS, D.J.; XIAO, B.; HA, Y. *et al.*: «The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemmagglutinin». *Science* 2004; 303: 1838-1842.
68. STEVENS, J.; CORPER, A.L.; BASLER, C.H.F.; TAUTENBERGER, J.K.; PALESE, P.; WILSON, I.A.: «Structure of the uncleaved human H1 hemmagglutinin from the extinct 1918 influenza virus». *Science* 2004; 303:1866-1870.
69. NEROME, K.; HIROMOTO, Y.; LINDSTROM, S.E.; SUGITA, S.: «Analyses of evolutionary and virulence divergency of Hong Kong H5N1 influenza A viruses isolated from humans». En: OSTERHAUS, A.; COX, N.; HAMPSON, A. (eds.): *Options for the control of influenza IV*, 213-223. Excerpta Med, Amsterdam 2001.
70. RODRÍGUEZ, TORRES, A.: «La amenaza de la gripe pandémica». *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1998; 16: 107-109.

Agradecimiento: Al Prof. D. R. Ortiz de Lejarazu por la cesión de parte de la iconografía.

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL SARS
Y DE LA INFLUENZA AVIAR**
*EPIDEMIOLOGICAL PERSPECTIVES ON SARS
AND AVIAN INFLUENZA*

Por el Excmo. Sr. D. JUAN DEL REY CALERO
Académico de Número de la Real Academia Nacional
de Medicina

Resumen

El SARS es una infección respiratoria causada por Coronavirus, del Orden de los Nidovirales, RNA, se conocen los grupos 1 que afecta a perros, gatos, cerdos, el agente humano es el 229 E, el grupo 2 que afecta bovinos, móridos, el agente humano es el OC43, y el grupo 3 de patología aviar. La epidemia surgió en febrero de 2,003 en Guangdong en el Sur de China, por el consumo de animales exóticos (Civeta, etc.) y se extendió por contagio interpersonal, a otras zonas de Asia, América y Europa. La infección tiene un periodo de incubación de unos 2 a 7 días. El virus se transmite persona a persona, pero también por las excretas y aguas residuales. La tasa reproductiva básica es de 2 a 4, se considera que se infectan 2,7 a partir del caso inicial. En junio de 2003 había afectado a mas de 8.000 personas con 774 muertes .La Mortalidad es próxima al 10 %, mayor en las personas de edad, casi del 50 % en los de mas de 65 años. Es importante establecer con rapidez los protocolos de actuación con las características clínicas, epidemiológicas y de prevención.

La influenza aviar es una infección causada por un Orthomixovirus del tipo A de la gripe, en que las aves migratorias y patos salvajes son el principal reservorio. Los virus aviares corresponden a los H5, H7, H9. En 1997 se observó que el tipo AH5N1 saltó la barrera Inter.-especie y afectó a 18 personas de las que 6 murieron. A finales de 2003 y en el 2004 se ha descrito esta gripe de los pollos en Asia. La FAO ha insistido como la medida mas eficaz para su lucha el sacrificio de las aves en las granjas afectas. Se han establecido suprimir las importaciones de estos países. No hay evidencia del contagio interhumano a partir del contagio por aves, ni al hombre por vía alimentaria.

Abstract

SARS is a respiratory infection caused by Coronavirus (Nidoviruses, RNA) from which 3 groups are known. Group 1 affects dogs, cats, pigs, and the human agent is 229 E. Group 2 affects bovines or rodents, and the human agent is OC43. And group 3 corresponds to the avian pathology...

The epidemics emerged on February 2003 in Guangdong, South China, due to consumption of exotic animals (Civeta, etc.), and it spread through interperson contagion to other regions in Asia, America and Europe.

Incubation period is about 2-7 days. Transmission Of the virus is person-to person, but also by excretions and residual water. Basic reproductive rate is 2 to 4, and it is considered that 2,7 persons are infected from the initial case.

In June 2003, SARS affected over 8,000 people and 774 were killed. Mortality approaches to 10%, and it is higher among older people rising up to 50% in those aged over 65 years.

It is important to quickly establish action protocols regarding clinical, epidemiological and prevention aspects.

Avian influenza is an infection caused by type A Influenza Orthomixovirus, in which migration birds and wild ducks are the main reservoir. Avian viruses correspond to H5, H7, H9. In 1997 it was observed that type AH5N1 jumped interspecies barrier and affected 18 humans, and 6 of them died.

At the end of 2003 and in 2004 this type of poultry flu was described in Asia. FAO has emphasized that sacrifice of chicken in affected farms is the most effective measure to fight against the disease. It has also been established suppression of imports from these countries. There is no evidence on interperson contagion from chicken contagion, nor on food-borne contagion to humans.

Definición: El SARS (Severe Acute Respiratory Syndrom) es una infección respiratoria causada por un Coronavirus. Esta enfermedad apareció en febrero del 2.003 en Asia y desde allí se extendió a otras partes de América Norte y Sur y a Europa.

Clínica: La sintomatología y semiología como indica su nombre corresponde a una infección respiratoria aguda severa con el patrón de una neumonía atípica con áreas confluentes e intersticiales, que la tomografía axial muestra áreas de consolidación subpleural. También hay casos que cursan con diarrea, por lo que el contagio se produce por gotitas respiratorias y por excretas.

La enfermedad tiene un período de incubación variable de 2 a 7 días, aunque puede ser mas largo, de una a dos semanas. Las manifestaciones prodrómicas son las de un síndrome febril con 38 °, cefaleas, mialgias, astenia etc. A continuación aparece el cuadro de neumonía atípica con hipoxemia ,que en un 10 % de los casos

requieren respiración asistida Muestran leucopenia, linfopenia, trombocitopenia.

Están elevadas la alanin-amino transferasa, la creatinin cinasa, la LDH, niveles de Dimero-D, y están bajos el Na y K, así como el tiempo parcial de tromboplastina activado se prolonga. La mortalidad es próxima al 10 %, pero depende del tramo de edad afectado, menos del 1 % en los jóvenes <24 años, del 6 % entre personas de >25 años, del 15 % entre 45 y 65 años, y del 50 % en los >65 años..

La no actuación de los Antibióticos y los estudios con PCR, hasta el aislamiento y cultivo en células Vero permitió la identificación de el agente , un Coronavirus, que cumplía los postulados de Koch, por lo que la OMS lo consideró así el 16 de abril 03.

El virus está en grandes concentraciones en las secreciones respiratorias, y en menor cuantía en las excretas de los pacientes y en el periodo de convalecencia.

Categorías de caso, criterios: Los CDC según los criterios clínicos de laboratorio y epidemiológicos ha establecido las siguientes categorías:

Caso probable de SARS, que cumple los criterios clínicos de infección respiratoria y probable exposición al Coronavirus.

Caso confirmado: enfermedad compatible bien sea precoz, leve, moderada, o grave, confirmada por Laboratorio.

1. *Los criterios diagnósticos, de tipo clínico*, se establecen como: *Enfermedad precoz* con fiebre, escalofríos, cefalea, diarrea, odinofagia, rinorrea.

Enfermedad leve-moderada, fiebre de 38°, afectación respiratoria (tos, disnea)

Enfermedad respiratoria grave, lo anterior con evidencia de neumonía por radiología y distrés respiratorio agudo. La autopsia a veces lo confirma

2. *Criterios epidemiológicos*: exposición posible a un Coronavirus o SARS en los 10 días anteriores a la manifestaciones de enfermedad.

Viaje al extranjero donde se han detectado casos.

3. *Criterios de laboratorio*: detección de Anticuerpos (PCR, rt-PCR, ELISA, EIA etc) por una prueba validada. O aislamiento del Virus o RNA a partir de una muestra clínica

4. *Criterios de exclusión*: puede explicarse el proceso por otro diagnóstico.

La no presencia de anticuerpos a la 4 semanas del comienzo.

EXTENSIÓN DE LA EPIDEMIA DE SARS

Fue detectada por primera vez en Guangdong al Sur de China, en noviembre de 2002, el 15 de marzo del 2003 la OMS alerta a las autoridades sanitarias, médicos y a las personas que viajan del riesgo emergente, considerando como «hot zones» de SARS, China, Hanoi, Singapur, Toronto. A finales de abril se estiman 4.000 casos, el 2 de mayo 6.000, el 8 de mayo 7.000, en este momento que coincide con el mayor pico de la epidemia se detectan unos 200 casos diarios, el 3 de julio se habían diagnosticado 8.000 pacientes. El reservorio son los animales que albergan los Coronavirus, como la Civeta el principal implicado, por el consumo humano en la última epidemia en Guangdong en China, pero también los mapaches, el hurón y el gato pueden ser reservorios. El microbiólogo Yi de la Universidad de Hong Kong se traslada a Guangzhou y en el Xinyuan Market compra civetas por 6 \$ cada una. Este animal es una «delicadeza», encuentra 16 casos positivos de 21 animales El negocio de animales exóticos en Guangdong es de 100 a 200 M de \$. Persuade al Dr Zhong director del Instituto de Enfermedades Respiratorias, que había instaurado el tratamiento de los casos de SARS. Al comparar los árboles filogenéticos de estos virus RNA, de la civeta y de los humanos eran más que similares, eran idénticos.

Los casos de la epidemia se producía en el entorno familiar, en medios donde el hacinamiento era intenso, o con alta densidad de población hoteles, hospitales etc.

La *Tasa reproductiva básica* es decir el patrón de contagio, obedece a la formula:

$Ro = S / A \cdot D$, donde S indica el número de susceptibles, A el tiempo de adquisición de la infección y D duración de la protección por Anticuerpos etc, también se ha utilizado la $Ro = \beta \cdot C \cdot D$, siendo C los Contactos y D duración de la enfermedad, y β la peculiaridad de transmisión de la infección. En la estudiada en Hong Kong era de 2 a 4. Riley estima que los casos secundarios eran de 2,7 por caso inicial. El virus se transmite persona a persona, pero también a través por las excretas y aguas residuales de los edificios. En Toronto la epidemia fue introducida por una señora que visitó a sus parientes en Hong Kong en febrero 2003. En Canadá se produjeron 251 casos con 43 muertes. En Hong Kong 1.755 casos y 299 muertes., en China 5.237 casos y 349 muertes, en Taiwán 346 casos y 37 muertes, en Singapur 238 casos y 33 muertes. En total 8.098 casos

y 774 muertes. Un nuevo rebrote epidémico ha surgido en abril del 2004, por la contaminación de Laboratorio en China y a casos familiares en su entorno.

ERRADICACIÓN

Una efectiva intervención sobre la cadena epidemiológica puede interrumpir la transmisión. Para ello es necesario el diagnóstico precoz con pruebas de Sensibilidad, Especificidad y Valor predictivo. Si se rompe la cadena epidemiológica del contagio persona-persona el agente no sobrevive con lo que la epidemia se puede agotar. La existencia de animales reservorios complica la erradicación, por lo que se debe evitar el contacto con los animales que se conoce puedan ser reservorios para estos Coronavirus.

Los Coronavirus que afectan a las personas pertenecen al grupo 1 HCoV 229E, y al grupo 2, HCoV, OC43.

La detección se hace mediante pruebas para detectar los Anticuerpos IFA (Indirect fluorescent Antibody), o ELISA. El aislamiento en cultivo de tejidos, el test PCR o RT-PCR (reverse transcriptasa). El no presentar Anticuerpos específicos a las 3 semanas del comienzo de la sintomatología hace descartar el caso sospechoso.

VIROLOGÍA DE LOS CORONAVIRIDAE

Pertencen al orden de los Nidovirales, familia Coronaviridae, genero Coronavirus Son virus +RNA de 60 a 130 nm de diámetro, el más grande de los conocidos, las partículas virales que se proyectan en su superficie le dan esa forma de corona. Se distinguen la glicoproteína de la Spicula S de 180-220, la proteína de la membrana M de 23-35, la proteína de la nucleocapside 50-60, una pequeña proteína en la envoltura E de 9-12, y la Hemaglutinina Esterasa HE de 65 kDa. Cuando el virus invade la célula y se replica produce una larga secuencia proteica que la proteasa principal, que es muy sensible al pH, recorta para formar nuevas partículas de virus, lo que puede ser importante para el desarrollo de fármacos bloqueantes de la misma.

Pertencen a 3 grupos: *el grupo 1* canino, felino con peritonitis infecciosa (FIPV), hemaglutinante encefalomiелitis del cerdo (HEV),

y el humano 229E; *el grupo 2* bovino, murino hepatitis (MHV), y el humano OC43, y *el grupo 3* de virus de bronquitis aviarias (IBH). Marra ha propuesto un grupo 4.

Se distinguen la familia y el género de los Arterivirus, que causa arteritis equina. También se describe el género Torovirus. Todos ellos tienen como huésped a los vertebrados. La OMS ha dedicado el descubrimiento del patógeno del SARS al médico italiano Carlo Urbani, pues fue el primero en detectar la enfermedad en Hanoi (Vietnam) y murió por neumonía el 29 de marzo.

Se han comercializado diversas vacunas de tipo veterinario para prevenir estas infecciones, excepto para las bronquitis infecciosas de las aves. La glicoproteína S (spículas) del virus es un buen antígeno, para la posible preparación de vacunas. En el Centro de Ciencias genómicas de la Agencia Oncológica Canadiense han descifrado el código genético con 29.736 pares de bases de nucleótidos; es el más grande de los conocidos. La secuencia del virus permite desarrollar nuevos test diagnósticos y realizar vacunas preventivas.

En el NIAID Kanta Subbarao ha descubierto que los ratones desarrollan anticuerpos frente al virus del SARS, que, aunque no enferma al ratón el virus, es capaz de adherirse e infectar a las células de las vías aéreas; los anticuerpos que impiden que nuevos virus infecten pueden transferirse a otros ratones y protegerlos, por lo que el sistema inmunitario del ratón es un buen modelo de estudio para probar la potencial eficacia de vacunas y para probar fármacos.

Una vacuna de DNA del Coronavirus del SARS codifica una proteína de la cubierta por la que se adhiere el virus, que no produce infección, pero sí reduce la carga viral en ratones, según Gary Nabel (*Nature* 2004; 428: 561-564).

PROTOCOLOS DE ACTUACIÓN

Es posible la eventualidad de un nuevo brote epidemiológico estacional, por las características epidemiológicas de estos virus respiratorios. En Madrid se han elaborado unos Protocolos de actuación que constan de varias fases, desde la sospecha de infectados con el consiguiente aislamiento hasta la confirmación del caso. Para el diagnóstico se sigue también un protocolo. Los posibles infectados se deben remitir a un Hospital de referencia con adecuado sis-

tema de aislamiento, de habitaciones individuales con presión negativa, como puede ser el Hospital Carlos III de Madrid, donde se hayan establecido protocolos adecuados de medidas preventivas para evitar los contagios nosocomiales. Es preciso, pues, la formación de un comité multidisciplinar, el refuerzo de personal, la habilitación de zonas de aislamiento, y protocolos diagnósticos y terapéuticos

Todavía **hay incógnitas que deben aclararse:**

- Cómo es la distribución de los Coronavirus en los animales reservorios.
- Qué factores determinan los periodos de silencio Inter.-epidémicos.
- Cuál es la concentración de virus o carga viral en los distintos tejidos.
- Si existen portadores sanos, y excretan virus en cuantía suficiente para infectar.
- Cuáles son las manifestaciones mínimas para detectar un caso índice.
- Por qué los niños padecen con menos frecuencia el SARS.
- Qué importancia juega la posible comorbilidad con Clamidias etc.

CONSIDERACIONES EPIDEMIOLÓGICAS SOBRE LA INFLUENZA AVIARIA

Definición: La influenza aviar o «gripe de los pollos» es una enfermedad infecciosa causada por el virus de la gripe A, en la que las aves son vulnerables, y las aves migratorias y concretamente el pato salvaje son su principal reservorio. Las aves de corral domésticas en particular los pollos y los pavos son muy vulnerables. Los virus tienen forma esférica en los que sobresalen unas espículas de la membrana viral, la Hemaglutinina HA formada por un trimero de polipéptidos de un PM de 224.640 y la Neuraminidasa NA, una enzima que cataliza las terminaciones del ácido siálico con un PM de 240.000. Las variaciones antigénicas en estas HA y NA originan los distintos tipos virales, distintos en cada epidemia. Se conocen 15 subtipos de virus que infectan a las aves, con amplios reservorios, los de mayor virulencia han sido los causados por el tipo A, subtipos H5, H7, H9.

Los cuadros clínicos varían desde sintomatología leve a altamente contagiosos y de gran mortalidad.

Virología: Pertenecen a la familia Orthomixoviridae; son virus – RNA, con los géneros Influenzavirus A, B, C. Los virus A son los mas epidémicos, producen pandemias, los B son endémicos, y C más leves y circunscritos. Los virus A infectan a una gran variedad de animales, el reservorio es las aves acuáticas; los subtipos que más pueden circular a través del hombre son el H1N1, H1N2 , H3N2, etc.

Aspectos históricos: En 1931 Shope describe la gripe del cerdo; en 1933 Andrew y Laidlow aislan el virus y Smith en el hurón el subtipo A; en 1934 Burnet lo cultiva en embrión de pollo; en 1939 Francis y McGill descubren el B; en 1945 Hirst describe el fenómeno de la Inhibición de la Hemaglutinación IHA; en 1950 se describe el tipo C.

La epidemia denominada gripe «española», que causó unos 22 M de muertes antes de conocerse el virus, en cadáveres mantenidos en Alaska ha permitido la reconstrucción de la glicoproteína HA, que se une a un receptor de la célula huésped; era un virus A H1 N1 Sw con características de virus aviares. Se conocen 15 serotipos diferentes de HA. En 1957 surgió en Singapur el A H2 N2, y causó 2 M de muertes. En 1968, en Hong Kong, surge el H3N2. En 1976 aparece en EE.UU. un H1N1 swine-like, en 1977 surge de nuevo el H1N1, la denominada *gripe rusa*. En 1997 el H5 N1 y en 1999 H9N2; en 2003 de nuevo H5 N1 y H7N7 y en el 2004 H5N5 los de tipo aviar con contagios humanos.

Virus aviares: Los brotes surgidos de los subtipos aviares corresponden pues al H5, H7, H9. El pato salvaje es uno de los centros de diseminación de virus. El cerdo puede actuar de mezclador de virus, pero no necesariamente pasan por este animal.

Los receptores de las células al virus son derivados del ácido siálico o neuramínico para los virus humanos 2-6 galactosa sustituido de la glicoproteína, para los aviares 2-3 sustituido del ácido siálico.

Se ha visto que algunos de estos virus pueden saltar la barrera inter especies y afectar al hombre, como en el brote de Hong Kong de 1997, que afectó a las aves y produjo 18 casos humanos con 6 muertes. Se implantaron unas medidas eficaces, pues hasta febrero de 2003 no se produjeron 2 casos en Hong Kong y 1 murió. En 1999 en Hong Kong se detectó en niños A H9 N1 pero la epidemia fue leve y autolimitada. En el 2003, en la industria avícola de Holanda, se constataron 89 infecciones humanas por el AH7N7; murió un

veterinario. En el final del 2003 y comienzos del 2004 se han descrito casos de AH5N1 entre la producción aviar de Asia, en Corea del Sur, Japón, Indonesia, Vietnam, Tailandia, Laos, Camboya y China. También se ha descrito en Delaware en EE.UU. y en la Columbia británica de Canadá (H7N3).

En el 2004 se han confirmado pacientes que murieron por gripe AH5N1 en las ciudades de Hanoi y Ho Chi Minh en Vietnam.

Variaciones antigénicas: Son virus que carecen en su replicación de los mecanismos de «corrección de pruebas» con lo que no pueden reparar los errores surgidos en este proceso, por lo que la cepa original cambia hacia una nueva variante antigénica que se denomina «*deriva*». Esto es lo que obliga a vigilar las cepas surgidas para preparar las vacunas adecuadas.

Pero presentan, además, otra característica: es su capacidad de intercambiar material genético con subtipos de diferentes especies; este proceso de recombinación de los dos virus originales y producir un subtipo distinto es lo que se conoce como cambios antigénicos mayores o «*shift*», dando lugar a pandemias de gran mortalidad.

Hay que considerar también las derivas o cambios menores de los virus en las epidemias gripales; así, la cepa A/Fujian 411/2002 (H3N2) presenta 13 cambios antigénicos en sus aminoácidos, lo que ha producido epidemias más tempranas y graves a finales del año pasado, según un estudio reciente del CDC (MMWR) 2004.

La mortalidad por gripe puede ser directa por una neumonía viral aguda, a veces fulminante como en la pandemia del 1918. Puede ser indirecta en enfermos crónicos, cardiovasculares, respiratorios EPOC, nefróticos, diabéticos, etc., y debido a una infección secundaria por bacterias resistentes a los antibióticos.

En las pandemias se señala la Fase de alerta, que en la fase 0 se refiere al período interepidémico, la fase 1 con emergencia de un nuevo virus (HA/NA), fase 2 varios focos de infección de dicho virus (fuera de Europa), la fase 3 cuando se aísla en Europa, la fase 4 la pandemia afecta al país, y 5 vuelta a la fase interepidémica 0.

El contagio de las cepas aviarias. Así el contacto directo o indirecto de las aves domésticas con las aves migratorias acuáticas es una de las causas de las epidemias. El hacinamiento de estos animales vivos en los mercados, el contacto con excretas de los mis-

mos son fuente de contagios. Se ha visto que incluso virus de baja patogenicidad después de circular en poblaciones de aves de corral, pueden mutar y convertirse en hiperpatógenos.

Uno de los virus más patógenos H5 N1 puede ser eliminado en gran cuantía por las heces, puede sobrevivir largos períodos en los tejidos de los animales enfermos y en el agua hasta 4 días a 22° y un mes a 0°. La epidemia por este virus que comenzó en la República de Corea en diciembre del 2003 se ha extendido a otros países asiáticos, Camboya, China incluida Taiwán, Indonesia, Corea del Sur, Japón, Laos, Tailandia, Vietnam. En Japón se han detectado cinco cuervos infectados. En la Columbia Británica (Canadá) ha aparecido un H7N3 muy virulento para las aves pero no para los humanos. Ha aparecido algún caso menos virulento en EE.UU.

Esta cepa ya demostró su capacidad de infectar al hombre en 1997, y lo ha repetido en el 2004 en Vietnam, con 22 pacientes de los que 15 murieron, y en Tailandia con 11 casos de los que murieron 8, que se han asociado al contacto con aves enfermas, pero la OMS no tiene información que se transmita la enfermedad persona a persona. En el análisis científico del equipo de Enfermedades Tropicales del Hospital de Ho Chi Minh de Vietnam y del equipo de la OMS Jeremy Farrar y Peter Horby, analizando 10 vietnamitas infectados por el virus de la gripe A, confirmados por RT-PCR (transcriptasa reversa), indican una elevada mortalidad del 80 %, y un plazo desde la infección a la muerte de 9 días. En 8 pacientes se documentó un estrecho contacto con aves en la semana anterior, lo que sugiere un período de incubación de 2 a 4 días. Las características clínicas al ingreso fueron fiebre, tos, diarrea y respiración entrecortada, alteraciones en las placas de tórax. El laboratorio muestra una linfopenia y trombocitopenia, marcada inversión CD4/CD8. La recuperación de los linfocitos se produjo en los 2 sobrevivientes. Se cultivaron los virus en células de riñón de perro de una sola capa de Madin-Darby, y se efectuaron pruebas de inmunofluorescencia.

Tratamientos. Parte de los datos epidemiológicos se obtuvieron de las entrevistas con los pacientes o sus familiares y de las historias clínicas. A 5 pacientes se trataron con inhibidor de la Neuraminidasa: Ozeltamivir (35 mg 2 veces al día) durante 4 días. A dos pacientes Ribavirina (800 mg y 400 mg 3 veces al día. Todos los pacientes tenían un deterioro importante del intercambio de gases (*N. Engl. J. Med.* 2004, 350: 1179-88).

Los antivirales empleados son los inhibidores de la replicación como la Ribavirina. Los inhibidores de los canales iónicos Amantadina, Rimantadina. Los inhibidores de la Nieraminidasa Zanamivir, Ozeltamivir.

La secuencia del virus muestra que todos los genes son de origen aviar y no han adquirido genes humanos, lo que incrementaría la capacidad de transmisión interhumana. Los laboratorios de la red global de Vigilancia de Influenza de las cepas de 1997 de Hong Kong y la más reciente de 2003 indican diferencias significativas por mutación del mismo. Las campañas de prevención evitaron la epidemia de gripe aviar en 6 años.

La exposición ocupacional aumenta el riesgo de la transmisión de virus como el de la Influenza A H5 N1 de aves a humanos, por lo que los avicultores, trabajadores de limpieza de excretas de estas aves por la exposición al virus son los de más riesgo.

MEDIDAS DE PROTECCIÓN, PREVENCIÓN Y CONTROL

La OMS y FAO y la Organización Mundial para la Salud Animal colaboran para establecer medidas de protección a efectos de la salud pública internacional .

La FAO insta al sacrificio masivo de pollos y pide ayuda internacional para compensar a los avicultores. La OMS ha iniciado acciones de apoyo nacionales para la investigación de brotes en Asia, y en humanos de detección rápida del H5N1, así como producción de vacunas.

La OMS ha advertido que si el virus aviar se recombinara con el de la gripe humana y produjera un nuevo patógeno con capacidad de transmisión interhumana podrá ocasionar una epidemia de una gravedad extrema.

Medidas de control

Vigilancia y diagnóstico adecuado de las enfermedades respiratorias.

Medidas de aislamiento y cuarentena de las zonas infectadas.

Sacrificio de lotes infectados. Destrucción y esterilización de material contaminado.

Vacunaciones frente a Serotipos patógenos H5, H7 (vacunas autorizadas).

Programa de bioseguridad

- Limpieza y desinfección de todo el material
- Barreras físicas
- Control de personal y tráfico
- Cloración y desinfección de los circuitos de agua
- Control de roedores y de aves salvajes.

Sacrificio de animales en los países afectados. Se deben sacrificar todas las aves enfermas en las granjas y de lotes en contacto, como medida eficaz para abortar la epidemia, como preconiza la FAO, procurando ayuda financiera a los afectados. Se estima que hasta el momento se han sacrificado unos 100 millones de aves para mantener la epidemia bajo control, 36 M en Tailandia, 36 M en Vietnam, 15 M en Indonesia, 5 M en China, 4 M en Pakistán.

Tailandia y Vietnam pretendían anunciar el fin de la gripe aviar. Pero la OMS no lo considera así, ya que por la experiencia acumulada, incluso en países con mejores sistemas de vigilancia, recursos adecuados y más limitados geográficamente, el control ha requerido hasta 2 años. También la FAO indica que aunque no hubiera animales con evidencias clínicas, no significaría que el Virus no siguiera circulando en el medio ambiente. La industria avícola tailandesa que mueve unos 1.200 M \$ al año ha sufrido un grave revés, ya que sus exportaciones a la UE y Japón que son sus dos principales clientes, las tienen prohibidas. La FAO insiste que antes de reponer los animales en las granjas hay que tomar unas estrictas medidas, y expertos internacionales tendrán que certificar la erradicación, antes de permitir las exportaciones.

Los trabajadores que participan en el sacrificio de aves deben de estar protegidos con ropa, calzado y equipos adecuados, deben estar vacunados contra los virus gripales e incluso tomar medicamentos antivirales como profilácticos,

Los casos y defunciones recientes en Vietnam y Tailandia por H5 N1 están asociados al contacto con aves enfermas, no hay información sobre la transmisión persona a persona. Los países mas afectados por estos virus son Camboya, Indonesia, Japón, R. de Corea,

Laos, China, Tailandia y Vietnam. Estos últimos tres países pretendieron anunciar el fin de la cuarentena, por lo que supone de pérdidas económicas el cese de las exportaciones, pero la OMS no lo estima así pues otros países, incluso con un sistema de control más desarrollado, han tardado más de 2 años en su erradicación.

Importaciones. Se prohíbe la importación de aves procedentes de países afectados y hacer un control exhaustivo de frontera de todos los productos avícolas. En España según datos del Ministerio de Agricultura en el mes de Enero pasado entraron 21.850 pollos procedentes de EE.UU., lo que no llega al 1 %, de las importaciones, con valor de 150.000 €. El 92,5 % de las importaciones proceden de Francia, Portugal y RU.

Los consumidores deben asegurarse que estos alimentos de aves y huevos estén lo suficientemente cocidos para que se destruyan los virus. Por el momento no es necesario evitar el consumo de estos productos.

Viajes. Los que viajan a estos países deben estar vacunados frente a la gripe, y no visitar mercados de aves vivas o granjas y contactos con estos animales. Las personas con alto riesgo de exposición a las aves infectadas se deben vacunar con las vacunas humanas de las cepas circulantes lo que permite reducir la coinfección con cepas aviáres

Vacunas. Las vacunas *antigripales trivalentes inactivadas* para los humanos (cepas circulantes en el año de AH1N1, AH3N2, y B), se deben vacunar todas las personas involucradas en el control de la epidemias y de los trabajadores que pueden transmitir la epidemias a personas de riesgo, contactos domiciliarios, además de las personas a riesgo > 65 años, los que viven en Residencias de ancianos, las personas afectas de enfermedades crónicas. En niños mayores de 6 años afectados de enfermedades crónicas está indicada la vacunación. Se dispone de vacunas de virus vivos atenuados adaptados al frío (2 cepas A y una B), aplicables por vía nasal.

Se disponen de *vacunas inactivadas para las aves* en emulsión oleosa, que reducen la mortalidad. En el control se puede utilizar aves centinelas no vacunadas en contacto con las vacunadas, si en estas centinela se aprecia una seroconversión indica que hay virus circulantes en el lote. No se deben utilizar vacunas vivas. No obs-

tante la aplicación de vacunas no está autorizada en Europa. El problema es que en caso de pandemia los embriones de pollo escasean, y en el caso del H5N1 este método de cultivo no es adecuado porque el virus mata al embrión de pollo antes que se haya desarrollado suficientemente, se está investigando con cultivos celulares, Debe modificarse el virus por ingeniería genética para su desarrollo en el embrión de pollo.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria, ante la extensión e importancia de la influenza aviar conocida como «gripe del pollo» informa que la Agencia se mantiene en contacto con las Organizaciones de N.U., OMS,FAO, Instituciones Europeas y Agencias alimentarias de distintos países:

- Que esta epidemia se está presentando en los países asiáticos.
- Es una enfermedad conocida desde hace años en el ámbito de la sanidad animal y que excepcionalmente puede transmitirse al hombre, como se ha constatado en el Sudeste asiático, para lo que se requiere un contacto reiterado y próximo con animales enfermos.
 - El contagio de las aves a los humanos es por vía inhalatoria.
 - No hay evidencia de contagio al hombre por vía alimenticia.
 - Las medidas propuestas por los Organismos internacionales de las N.U. adoptadas por la UE. Prohíben las importaciones desde las zonas asiáticas afectadas de aves vivas y productos no procesados., con un cierre cauteloso de fronteras a las importaciones. Y evitar la posibilidad de contagio de aves domésticas y silvestres de Europa y por tanto de España.

BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria. Ministerio de Sanidad y Consumo, 28 enero 2004.
- ANAD, K. *et al.*: *Coronavirus main proteinase structure: basis for design anti-SRAS drug* *Science* 2003; 300:1763-7
- ANDREWES, C.H.: «Epidemiology of Influenza». *Bull WHO*8, 595, 1953.
- BELSHE, R.B.; MENDELMAN, P.M. *et al.*: «The efficacy of live attenuated, cold adapted, trivalent intranasal influenza virus». *N.Engl.J.Med.* 1998; 338: 1405-12.
- BROWN, E.G. *et al.*: «Comparative analysis of the SARS Coronavirus: a good start to a long journey». *Lancet* 2003; 361: 1756-7.
- CDC Update Outbreak of SARS Worldwide, *MMWR* 3; 52: 241-48.
- CDC SARS Singapore 2003. *MMWR*2; 52: 405-11.

- CDC SARS –Taiwan 2003. MMWR2; 52: 461-66.
- Ciba Symposium Biology of Mixovirus Infection, *Ciba Summit N.J.* 1964
- COUCH, R.B. *et al.*: «Influenza its control in persons and populations». *J.Inf.Diseases* 153, 431-440, 1986
- DEL REY CALERO, J.: *Método epidemiológico y salud de la comunidad Interamericana.* McGraw Hill, 1989.
- DEL REY CALERO, J.; Calvo, J.R.: *Como cuidar la Salud.* Harcourt Brace. Madrid, 1998.
- DROSTEN, C. *et al.*: «SARS Identification of a novel Coronavirus in patients with SARS». *N.Engl.J.Med.* 2003 b ; 9:325-27.
- DYE, C. *et al.*: «Modeling the SARS epidemic». *Science* 2003 published online May 23.
- ENSERINK, M.: «Infectious Diseases. Clues to the animal origin of SARS». *Science* 2003a; 300: 1351.
- HATTA, M. *et al.*: «Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 viruses». *Science* 2001; 293: 840-2.
- HOLMES, K.V.: «SARS Coronavirus a new challenge for prevention and therapy». *J. Clin Inv* 2003; 111: 1605-9.
- HOLMES, K.V.; ENJUANES, L.: «The SARS coronavirus: a postgenomic era». *Science* 2003; 111: 1605-9.
- HANNOUN, C. *et al.*: «Survey of Influenza laboratories and surveillance methods in Europe». *Europ J. Epidemiology* 2000; 16: 217-22.
- IZURIETA, H.S.; THOMPSON, W.W. *et al.*: «Influenza and the rates of hospitalisation for respiratory disease among infants and young children». *N.Engl.J.Med.* 2000; 342: 232-9.
- KILBOURNE, E.D. *et al.*: «Immunology methodology» in *Influenza diagnosis and research.*
- KILBOURNE: «Future influenza vaccines and the use of genetic recombinants». *Bull. W.H.O.* 41: 643, 1969.
- MANDELL, G.L.; DOUGLAS, R.G.; BENETT, J.E. 5 ed. Churchill Livingstone. Philadelphia 2000.
- MARRA, M.A. *et al.*: «The Genoma sequence of the SARS- associate Coronavirus». *Science* 2003; 300: 1399-404.
- MENDELMAN, P.M. *et al.*: «Safety, efficacy and effectiveness of the Influenza virus vaccine, trivalent, types A,B live cold adapted», *Vaccine* 2001; 19: 2221-6.
- MURPHY, B.R. *et al.*: «Avian-human reassortant influenza. A viruses derived by mating avian and human influenza virus». *J. Inf. Diseas.* 1984; 150: 841-50.
- VON MAGNUS, P. *et al.*: Report series 408 WHO. Geneva 1969.
- PEIRIS, M. *et al.*: «Human infection with influenza H9N2». *Lancet* 1999: 354: 16-7.
- PEIRIS, J.S. *et al.*: «Coronavirus as possible cause of SARS». *Lancet* 2003, 361: 1319-25.
- PIEDROLA, G.: *Medicina Preventiva y Salud Pública.* 10 ed. Masson. Barcelona 2001.
- RILEY, S. *et al.*: «Trasmission Dynamic of the etiological agent of SARS in Hong Kong». *Science* 2003; 300; 1961-6.

- ROSLING, L. *et al.*: «Pneumonia causes panic in Guandong province». *BMJ* 2003; 326: 416.
- SCHULZE, J.T.: «Structure of Influenza Virus». *Virology* 47: 181, 1972.
- SPURGEON, D.: «Toronto succumb SARS a second time». *BMJ* 2003; 1162.
- SUZUKI, Y. *et al.*: «Sugar Caïn and receptors and determinants of host range of influenza virus». *Congress Series Elsevier* 2000; 21-5.
- TRAN TINH HIEN; FARRAR, J.; HORBY, P.: *N. England J.Med.* 2004; 350: 1179-88.
- YEOH, E.: «National Response to SARS Peoples Republic China». *World Global Conference on SARS 18 jun Kuala Lampur.*
- WHO Influenza Pandemic Preparedness Plan 1999. WHO document.
- WHO SARS status of outbreak and the lesson for the immediate future. Geneva 2003.
- WHO Can SARS be eradicated or eliminated 2003.
- WHO Collaborative Network for SARS Diagnosis: a multicentre collaboration to investigate the cause of SARS. *Lancet* 2003; 36: 1730-3.

**DATOS ACTUALES SOBRE VIRUS DE LA GRIPE
DE PATOS SALVAJES Y POLLOS, Y VIRUS
DE LA GRIPE TIPO C.
AGENTES ANTIGRIPALES (*)**

***PRESENT DATA ON INFLUENZA VIRUS ISOLATED
FROM DUCKS AND CHICKENS, AND INFLUENZA
VIRUS C. ANTI-INFLUENZA DRUGS***

Por el Excmo. Sr. D. JOSÉ ANTONIO CABEZAS
FERNÁNDEZ DEL CAMPO (**)

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia
Catedrático Emérito de la Universidad de Salamanca

Resumen

Dentro de los amplios campos de investigación de la Glicopatología y la Glicoterapéutica, el estudio de los tres tipos de virus de la gripe humana (A, B y C), el de la gripe de diversas especies de aves (particularmente las migratorias como el pato salvaje, por ser un reservorio de virus), así como el de los agentes que pueden prevenir o vencer epidemias/pandemias ocasionadas por la mayor parte de estos virus, constituye un área de relevante interés, no sólo científico sino por la enorme repercusión sanitaria y las cuantiosas consecuencias económicas.

(*) Extracto de la Ponencia dictada en la Real Academia Nacional de Medicina el 31 de marzo de 2004, con el título: «Virus de la gripe: Algunos aspectos enzimáticos. Nuevos agentes antigripales». También incluye lo esencial de la Conferencia impartida en la Real Academia Nacional de Farmacia el 1 de abril de 2004, con el título: «Glicopatología y Glicoterapéutica: nuevos datos. (Sobre virus de las gripes aviarias y humana. Agentes antigripales»).

(**) La parte experimental de los trabajos de nuestro laboratorio aquí reseñados ha sido realizada en colaboración principalmente con los Dres. M. Cabezas (†), E. Villar, C. Sánchez-Bernal, A. García-Sastre e I. Muñoz-Barroso; también, en menor proporción, con otros miembros indicados en la bibliografía. Asimismo, los resultados conseguidos han sido fruto de una prolongada cooperación mantenida con el Prof. C. Hannoun, y sus colaboradores P. Eid, B. Fiszon y J-C. Manuguerra, del Instituto Pasteur de París.

La investigación iniciada por algunos miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca a mediados de la década de 1970, desarrollada después en estrecha cooperación durante una veintena de años con la «Unité d'Ecologie Virale» del Instituto Pasteur de París (Prof. Claude Hannoun y colaboradores), ha logrado la realización de una veintena de trabajos que se han centrado principalmente en el estudio teórico-experimental de:

- La actividad sialidásica (=neuraminidásica) de los virus de la gripe humana tipos A y B.
- La actividad acetilesterásica del virus tipo C en humanos y en perros.
- La actividad sialidásica del virus tipo A del pato salvaje y del cerdo, en comparación con la de procedencia humana.
- Ciertos inhibidores de dicha actividad sialidásica como valiosos agentes antigripales, además de las vacunas, especialmente útiles en el caso de posibles pandemias futuras de gripe, originadas en aves.

Palabras clave: Gripe de patos salvajes.—Gripe de pollos.—Virus tipo C de gripe humana y de perros.—Antigripales: Inhibidores de la neuraminidasa (sialidasa).

Abstract

Present data on influenza virus isolated from ducks and chickens, and influenza virus C. Anti-influenza drugs.

Within the broad field of Glycopathology and Glycotherapeutics, research on influenza virus types A, B and C from humans and several bird species (particularly migratory birds such as ducks, since they are reservoirs for viruses), as well as the search for improved drugs designed for the prevention or treatment of epidemics/pandemics produced by most of those viruses are issues of relevant interest not only from a scientific point of view but also for repercussions on health and the important economical consequences.

The research work begun by the author and collaborators at the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the University of Salamanca (Spain) in the middle of the 1970's, developed later in close cooperation with the «Unité d'Ecologie Virale» of the Pasteur Institute of Paris (Prof. Claude Hannoun and collaborators), has been published in about twenty papers that mainly focus on the theoretic-experimental study of:

- The sialidase (neuraminidase) activity of human influenza viruses types A and B.
- The acetylesterase activity of type C virus from humans and dogs.
- The sialidase activity of type A virus from ducks and pigs, in comparison with that of humans.
- Certain sialidase inhibitors as useful anti-influenza drugs, especially in the case of possible future influenza pandemics of avian origin.

Key words: Duck influenza.— Chicken influenza.— Type C influenza virus from humans and dogs.— Anti-influenza drugs: Neuraminidase (sialidase) inhibitors.

1. INTRODUCCIÓN

La actual **Glicociencia** puede considerarse integrada por las ramas siguientes: **Glicobiología** (surgida a comienzos de la década de 1970 como materia específica, aunque sus orígenes son coincidentes y compartidos con los de la Bioquímica, a finales del siglo XIX); la **Glicopatología**, la **Glicoterapéutica**, la **Glico(bio)tecnología** y una incipiente **Glicogenética**.

Mientras que la Glicobiología se centra frecuentemente en el estudio de las funciones de los **glicoconjugados** (moléculas resultantes de la unión fuerte entre un compuesto glucídico, también llamado glicánico, y otro que puede ser protídico o lipídico, o con ambos), en condiciones normales o fisiológicas, la Glicopatología atiende a este estudio cuando las circunstancias son anormales (patológicas); mediante la ayuda suministrada por la Glicoterapéutica se intentará remediar esas disfunciones en que se hallan implicados los glicoconjugados gracias a la participación de los compuestos obtenidos por técnicas químicas (Glicotecnología) o bioquímicas (Glicobiotecnología), que actuarán preventiva o curativamente, o como agentes de diagnóstico, etc. (1).

A diferencia de otras ramas de la Bioquímica y la Biología Molecular —de las que puede considerarse como una derivación y con las que comparte numerosos aspectos estructurales y funcionales—, la Glicociencia (en particular la Glicobiología) ha merecido menor atención que aquéllas, siendo considerada por algunos autores como verdadera «Cenicienta» de la Ciencia. Todavía en el año 2001, de ello se lamentaba el prestigioso especialista S. Roseman (2), al mismo tiempo que ofrecía una explicación a este hecho cuando decía (traduciéndolo nosotros al español):

«En esta importante edad de la Genómica, la Proteómica y la Proteómica funcional, mis colegas me preguntan frecuentemente por qué la Glicobiología aparentemente ha ido por detrás de los otros campos. La contestación más sencilla es que los glicoconjugados son mucho más complejos, diversos y difíciles de estudiar que las proteínas o los ácidos nucleicos. [...] Los glicanos son diferentes porque frecuentemente son flexibles y se ajustan a las necesidades fisiológicas. En otras palabras, en estas situaciones, la función define la estructura, no viceversa.»

Las **interacciones de los glicoconjugados** situados en la zona externa de la membrana citoplasmática pueden tener lugar con

numerosos agentes muy diferentes, pertenecientes o no a otras células. Esquemáticamente:

Interacciones de los glicoconjugados de la membrana
citoplasmática con: hormonas,
 enzimas,
 anticuerpos,
 glicoproteínas desialiladas,
 toxinas,
 bacterias y
virus.

1.1. Virus de la gripe: Composición y nomenclatura

Limitándonos a los virus causantes de la gripe o influenza, Kilbourne (investigador destacado y autor de una importante monografía sobre la gripe) decía en 1987 (3):

«Ningún virus ha sido mejor estudiado, pero de pocas enfermedades [como la gripe] se entiende menos. Las glicoproteínas del virus de la gripe han llegado a ser modelos para los biólogos interesados en el ensamblaje de la membrana y la función; el conocimiento de sus estructuras terciarias (y aun cuaternarias) aventaja al disponible para la mayor parte de otras proteínas».

Datos generales acerca de la composición y características de los virus de la gripe tipos A, B y C se hallan en los libros de Microbiología, Virología, Biología Molecular, etc., o en recientes monografías (3-5). Otra información particular puede encontrarse fácilmente en algunas publicaciones de nuestro laboratorio (6-10), de las que probablemente puede considerarse que siguen siendo más actuales y complementarias entre sí las de las referencias 7-10.

Recuérdese que en la superficie del virus de la gripe tipos A y B se hallan glicoproteínas como la **hemaglutinina, HA** (que facilita la fijación del virus a la célula hospedadora y su introducción en ella), y la impropriamente llamada **neuraminidasa, NA** (que debiera denominarse **sialidasa**) (6), que es una enzima (la EC. 3. 2. 1. 18), la cual evita la aglomeración de los viriones recién formados; por lo que contribuye decisivamente a que éstos se difundan en el ambiente.

Otros componentes de la envoltura son la bicapa lipídica (procedente de la célula hospedadora), y las proteínas M que (integran la matriz de dicha envoltura), siendo la actividad de la M2 la de facilitar el paso de protones, acidificando el medio. En el interior se hallan las proteínas no estructurales NS1 y NS2, así como las nucleoproteínas NP y el ARN; éste, precisamente de polaridad negativa, en forma de ocho segmentos (en los tipos A y B, y siete en el tipo C). También hay tres polimerasas (la PA, ácida, la PB básica y la PB2).

A diferencia de la actividad sialidásica de los tipos A y B, en el C es la actividad *0*-acetilesterásica (EC. 3.1.1.53) la que existe, asociada a una proteína que excepcionalmente posee, además de su actividad esterásica —no sialidásica—, las de fusión y hemaglutinación; por eso se la conoce como glicoproteína HEF, por poseer actividades hemaglutinante, esterásica y de fusión.

«Son la nucleocápsida (formada por las nucleoproteínas NP y el ARN, al que envuelven helicoidalmente) y la proteína M antígenos internos que permiten distinguir los tres **tipos** de virus de la gripe: A, B y C» (del C trataremos más adelante). «Pero son los antígenos de superficie (hemaglutinina, HA, y neuraminidasa, NA, sialidasa) los que definen los **subtipos** propios del tipo A» (7), y no distinguibles en el B ni en el C.

En la **nomenclatura** vigente se expresa, para los virus humanos: El tipo (A, B o C); el nombre de la localidad donde se encontró la nueva cepa o estirpe; el número de ésta; y las dos cifras últimas del año. Actualmente se conocen un total de hasta 15 subtipos de HA (sólo 3 en la especie humana), que se indican abreviadamente con una H; y 9 de neuraminidasa (2 en los humanos), indicados por una N. (Por tanto, nada tienen que ver estas abreviaturas con los símbolos del hidrógeno o del nitrógeno, respectivamente).

1.2. Ciclo biológico y aspectos epidemiológicos

Muy abreviadamente, las *etapas* del ciclo biológico del virus de la gripe (tipos A y B) podrían resumirse así:

1. Fijación selectiva del virus a la célula hospedadora.
2. Penetración superficial en ella, actividad en que participa la hemaglutina, seguida de procesos de fusión endosómica, etc.
3. Liberación del ARN vírico en el interior de la célula.

4. Síntesis de constituyentes del virión, utilizando los celulares.
5. Migración de constituyentes del virión desde el interior hasta zonas más periféricas de la célula.
6. Liberación de viriones desde la superficie externa de la célula, mediante la actividad de la sialidasa o neuraminidasa.
8. Lisis de la célula que fue infectada.

Estas etapas podrían ser englobadas en tres grandes *fases*:

- a) Fijación y penetración del virus en la célula.
- b) Formación de sus constituyentes, a expensas de los de la célula, que quedaría gravemente dañada.
- c) Liberación de los viriones formados.

Se comprende que cualquier agente que interrumpa dicho ciclo en cualquier etapa del mismo puede convertirse en un potencial fármaco especialmente útil. En la práctica, los mejores resultados se han conseguido por los que actúan en las fases *b* o *c*, según veremos.

Desde 1918 en que se intensificaron los estudios acerca de este virus, demostrándose que era el verdadero agente causante de la pandemia —y no lo era una bacteria—, los progresos principales se realizaron a partir de 1931, cuando Shope aisló el virus de la gripe del cerdo, siendo en 1933 cuando Smith, Andrews y Laidlaw aislaron el de la gripe humana. Por tanto, los datos acerca de estos virus hasta 1931 son únicamente indirectos, y generalmente difíciles de conseguir y hasta de interpretar.

En lo concerniente al **subtipo A (H1N1)**, se sabe que ha circulado entre 1933 y 1957. En 1957 se produjo el *cambio brusco* («*shift*» o «*cassure*», de las nomenclaturas anglosajona y francesa, respectivamente) que determinó la aparición de una pandemia, la llamada «*gripe asiática*», afortunadamente menos peligrosa que la de 1918-19, con el reemplazamiento de ambos antígenos de la superficie vírica (HA y NA), resultando así el subtipo A (H2N2).

Este subtipo se ha mantenido hasta 1968, en que el cambio brusco sólo afectó a la HA, originándose así el **subtipo A/H3N2**, con la denominada «*gripe de Hong Kong*». Actualmente continúa evolucionando.

De forma sorprendente, en 1977, ha reaparecido (en los humanos, pues seguía estando en los cerdos) el **A(H1N1)**, responsable de la llamada «*gripe rusa*», el cual se mantiene.

Además de estos subtipos A que se presentan en la especie humana, otros (hasta un total de 15), se han hallado en especies animales muy diferentes (véase más adelante).

El tipo B, de menor gravedad que el A en cuanto a patogenicidad, es conocido desde 1940, y continúa circulando, únicamente entre los humanos. Carece de subtipos.

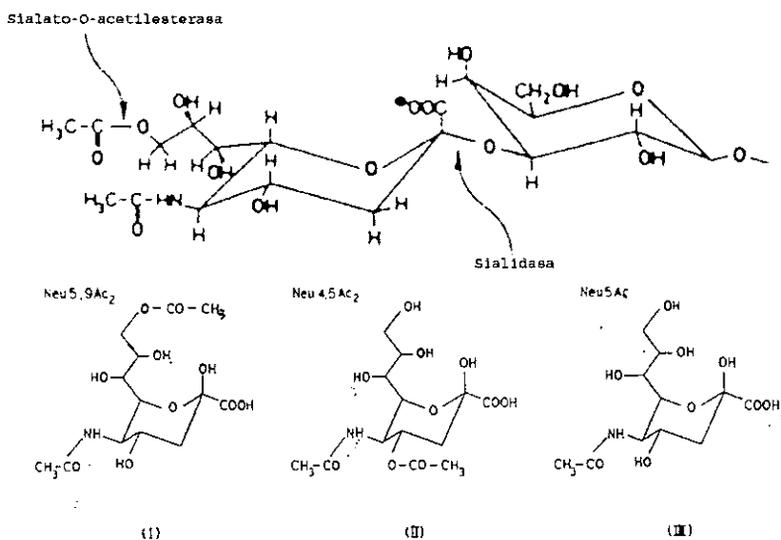
Ambos tipos experimentan cambios menores, que se detectan anualmente. Son los conocidos como *deriva* o *deslizamiento*, «*drift*» o «*glissement*», de las nomenclaturas española, anglosajona o francesa, según es sabido. De ahí procede la necesidad de actualizar la composición de las vacunas anualmente por lo general.

2. VIRUS DE LA GRIPE TIPO C

2.1. Características

Aun cuando es en 1947 cuando se descubrió por Taylor la existencia de un nuevo tipo de virus de la gripe, que se denominó C, la publicación de estos resultados no apareció hasta 1949 (7). El conocimiento de sus características avanzó lentamente, siendo desconocida la naturaleza exacta del receptor celular del virus todavía en 1985. En ese año, Herrler *et al.* indicaron que la enzima hidrolítica peculiar de este tipo no era la sialidasa sino la sialato-*O*-acetilesterasa (EC. 3.1.1.53), abreviadamente conocida como *O*-acetilesterasa, o también como acetilesterasa.

La acción de ambas se muestra en el siguiente esquema:



Trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que la especificidad de esta esterasa es menos estricta de lo que se pensaba (11). (Precisamente esta publicación es una de las dos referencias-tipo en la lista de la Nomenclatura Oficial de Enzimas relativas a dicha esterasa) (12). Tales peculiaridades y la obtención de datos adicionales (9, 10) nos llevaron a proponer ya en 1991 al Comité Internacional de Taxonomía de Virus la adscripción de este tipo como un probable «nuevo género» distinto del correspondiente al virus de la gripe tipos A y B (13).

2.2. Actividad esterásica del virus de la gripe tipo C. Su repercusión en la actividad sialidásica de los virus tipo A o B

La actividad *O*-acetilesterásica propia del virus de la gripe tipo C resulta útil para la actividad sialidásica de los virus tipo A o B, según se ha demostrado experimentalmente por primera vez mediante un trabajo de nuestro laboratorio (14).

En efecto, habiendo incubado en las condiciones adecuadas muestras del virus tipo C (Johannesburg/1/66), procedentes del Instituto Pasteur de París, como fuente de acetilesterasa, con sustratos naturales (principalmente glicoproteínas) conteniendo en la misma molécula los ácidos *N*-acetil-9-*O*-acetilneuramínico (fórmula I del esquema anterior) y ácido *N*-acetilneuramínico (fórmula III), y sometiendo seguidamente el producto resultante de la acción esterásica a la acción de la sialidasa de los virus de la gripe tipo A [(Singapore/6/86) (H1N1) o Shangai/11/87 (H3N2)], se obtuvo un rendimiento final, en cuanto a liberación de ácido *N*-antilneuramínico, de una cuantía entre doble y triple respecto al conseguido cuando se realizó un experimento paralelo en el que la acetilesterasa no pudo actuar por haber sido inactivada previamente al someter al calor dicho virus.

Se deduce, pues, que la actividad esterásica del virus de la gripe tipo C puede ser favorecedora, por vía indirecta pero eficaz, de la actividad sialidásica del virus tipo A (y muy probablemente también del B); y, por tanto, de la propagación de éstos.

Con sustratos, conteniendo ácido *N*-acetil-4-*O*-acetilneuramínico (fórmula II del esquema anterior) en lugar del *N*-acetil-9-*O*-acetilneuramínico —además de *N*-acetilneuramínico en la misma molécula—

, no se apreció diferencia significativa en condiciones paralelas a las del experimento precedente. La explicación lógica es que la sialidasa sólo actúa liberando la molécula del ácido *N*-acetilneuramínico de los sustratos que lo contienen, pero es inactiva sobre aquellos que llevan ácido *N*-acetil-4-*O*-acetilneuramínico; habiéndose comprobado que la posición en 4 del resto acetilo es un impedimento para la acción de esta enzima (15) y también para la acetilesterasa.

Precisamente un trabajo de nuestro laboratorio había participado anteriormente en el esclarecimiento de las peculiaridades de la especificidad de dicha sialidasa o neuraminidasa (EC 3.2.1.18), siendo una de las seis citas consideradas como referencias-tipo para la misma en la Nomenclatura Oficial de Enzimas (15, 16).

La discusión de estos aspectos no es faceta accesoria, puesto que tales cuestiones resultan decisivas cuando se intenta obtener inhibidores de la sialidasa que puedan ser útiles agentes antigripales, según se verá más adelante.

2.3. Datos sero-epidemiológicos sobre la infección por virus de la gripe tipo C en humanos y en perros en Salamanca

Ya en 1952 se realizó en EE.UU. el probablemente primer estudio epidemiológico acerca del virus de la gripe tipo C en humanos, cuando aún no se conocían algunas características importantes de este virus. Más tarde, se han llevado a cabo otros trabajos análogos en Inglaterra, Alemania, Japón, Francia y Filipinas.

Verosímilmente, el primer trabajo similar hecho en España es el efectuado en 1993 por nuestro laboratorio en colaboración con el Instituto Pasteur de París (17), limitado a 191 muestras de personas aparentemente sanas, habitantes de Salamanca, de edades comprendidas entre 2 y 80 años.

Sus sueros fueron ensayados en cuanto a la presencia o no en ellos de anticuerpos frente al virus de la gripe tipo C mediante pruebas de hemaglutinación-inhibición y de hemaglutinación.

Con el primer test, resultaron positivos un 60%, aproximadamente, de los sueros, hallándose los valores más elevados en el grupo de las edades comprendidas entre 16 y 50 años, siendo levemente inferiores en el de personas de edades mayores de 50 años, y, por último, notablemente más bajos en los de menos de 16 años.

De todo ello, se deduce que hubo intensa circulación de dicho

virus tipo C en Salamanca, al menos en esa época, eventualmente con repercusiones probables en las actividades de los tipos A o B, según se apuntó en párrafos anteriores.

Análogamente, un estudio similar hicimos también en 1993 (18) en 101 perros procedentes de las provincias de Salamanca y Burgos, usando las mismas técnicas antes indicadas.

Se detectaron anticuerpos frente al virus de la gripe tipo C en un 56% de las muestras.

Este tipo de virus, todavía considerado como exclusivo de la especie humana hasta hace pocas décadas, se sabe actualmente que puede hallarse también en otros mamíferos como los cerdos, como mínimo, e incluso en aves (18).

3. VIRUS DEL SUBTIPO A(H1N1) EN PATOS SALVAJES, CERDOS Y HUMANOS

En cooperación con el Instituto Pasteur de París, hemos investigado principalmente si, en patos salvajes, el paso a través del tracto digestivo (con valores de pH muy ácido y a temperaturas superiores a las de los humanos) podía tener o no repercusión en la actividad de la sialidasa del virus de la gripe aislado de estas aves migratorias (capturadas en la bahía del Somme, Norte de Francia, por C. Hannoun), en comparación con cepas del mismo subtipo A(H1N1) procedentes de cerdos y de humanos (19).

Se hizo un estudio experimental comparativo determinando en cuatro muestras de virus de procedencia humana, en tres de cerdos enfermos (una de ellas próxima a la histórica que se aisló en 1930), en tres del ave migratoria *Tadorna tadorna*, en dos de *Anas platyrhincos* (ánade real) y en una de *Anas acuta*.

Fueron determinados principalmente los siguientes parámetros:

- a) Capacidad de infección de dichas cepas de virus a las temperaturas de 35°, 37° y 40°C.
- b) Su capacidad de infección después de someterlas a tratamiento en medios con valores de pH 4.0 y 7.0.
- c) La resistencia a la inactivación después de su calentamiento a 40°C durante 30, 60 y 90 minutos.

En general (y de forma resumida), se puede concluir que los valores obtenidos en la determinación de estos tres parámetros fue-

ron para las cepas procedentes de patos salvajes los más elevados, siendo notablemente más bajos los correspondientes a las cepas de humanos, y éstos sólo algo superiores a las de origen porcino.

«Estas diferencias de comportamiento pueden correlacionarse con la adaptación de los virus a sus hospedadores. La temperatura interna de las aves excede los 40°C y en ellas el virus gripal tiene un tropismo entérico, lo que implica el pasar por tramos del tracto digestivo en que el pH es muy ácido. Estos resultados no contradicen, sin embargo, la hipótesis de una posible filiación entre los ortomixovirus de aves y los de mamíferos» (19).

En lo concerniente al **virus de la gripe tipo A** —el más peligroso, según es sabido— actualmente **ya no hay dudas sobre la posibilidad de contagio entre especies diferentes**, incluso pertenecientes a grupos taxonómicos relativamente apartados. Pero ello no quiere decir que la patogenicidad sea la misma en unas y en otras especies; como tampoco son similares, a veces, las vías por las que se produce la penetración vírica; así, en los mamíferos la entrada es principalmente por vía respiratoria, mientras en las aves tiene ésta lugar a través del aparato digestivo. En la cloaca y en los excrementos de las aves, así como en las aguas de los lagos por donde transitan las aves migratorias, se hallan abundantemente virus de la gripe. Por otro lado, el contagio entre aves salvajes y domésticas también puede producirse fácilmente en algunas zonas.

Entre los mamíferos, el hurón es un animal especialmente sensible a la gripe; en menor grado, lo es también el visón (lo que ha causado pérdidas económicas cuantiosas, en ocasiones, a criaderos de Rusia y Escandinavia); y, asimismo, pero en menor medida, el caballo, el gato, el tigre, el leopardo; finalmente, la ballena, la foca... y hasta el murciélago...; pero se cree que no lo es el conejo.

En cuanto a otras aves distintas del pato salvaje, es sabido que las gaviotas, y en general las aves de zonas costeras, son igualmente importantes *reservorios de este virus*; el cual ha sido hallado también en palomas, faisanes y codornices.

Pero, especial interés presentan en este sentido las aves de corral y granja, tales como gallinas y pollos, según se resume a continuación, cronológicamente.

4. VIRUS CAUSANTES DE LA GRIPE EN POLLOS

En 1983:

- La epizootia que produjo el virus **A(H5N2)** en **EE.UU**, causó la muerte del 80% de las *gallinas*. Se erradicó sacrificando unos 17 millones de estas aves; lo que representó pérdidas por valor de unos 61 millones de dólares, de la época.

1997:

- En la revista «*Science*» del 2 de mayo de aquel año se describe que la epizootia provocada por una cepa del subtipo **A(H7N7)** de virus de la gripe, aparentemente no peligrosa para los humanos, pero sí para los *pollos*, obligó en **Holanda** y en zonas limítrofes de Bélgica al sacrificio de unos 20 millones de pollos. Además, el 17 de abril de aquel año, un veterinario que había visitado una granja de gallinas infectadas falleció en un hospital. Su autopsia reveló la presencia de virus en sus pulmones.
- El dato más significativo de dicho año de 1997 fue la detección de 18 casos de personas afectadas por virus de la gripe tipo **A (H5N1)** en **Hong Kong**; de ellas murieron 6. La prensa internacional ha difundido ampliamente esta noticia. Más tarde, se ha señalado que los virus que posean segmentos de genoma similares a los del virus H5N1 son especialmente peligrosos para los mamíferos.

1998:

- Diversos estudios demuestran que los virus *del pollo* pueden pasar *directamente a los humanos*, sin necesidad de transmisores intermediarios. Esto se ha confirmado posteriormente (20).
- A su vez, aunque esa transmisión directa *entre humanos* no había sido demostrada, se estima que tampoco podía ser excluida.
- Por otro lado, Alexander y colaboradores (21) encuentran gran homología entre los genes de la hemaglutinina de los virus estudiados en *pavos* (**H7N7** precisamente) y los hallados en una persona afectada.

1999:

- La norteamericana Dra. Cox y su equipo (22) deducen que *la*

transmisión de virus de aves, de «humano a humano», es un riesgo que puede ocurrir †dicen literalmente† «a través de contacto físico próximo con pacientes infectados con el virus **H5N1**. Por el contrario, la exposición sólo mediante el trato social superficial con estos pacientes no se relacionó con infección por **H5N1**». [En el año 2003, Katz (23) ha confirmado esta idea, señalando que la transmisión entre humanos del virus **H5N1** ocurría, pero que era rara].

- Es el investigador norteamericano Webster (24) quien confirma que en traducción literal «se requieren cambios en la hemaglutinina y en la neuraminidasa para la adaptación de los virus de la gripe procedentes de *aves acuáticas salvajes a pollos*; por lo que cabe la posibilidad de que los *pollos* sean *hospedadores intermedios* en la transmisión zoonótica».
- Asimismo, también en aquel año 1999 dos casos de *infecciones humanas* causadas por otro subtipo de virus, el **H9N2**, se habían producido en Hong Kong, según los virólogos Subbarao y Shaw (25).

2000:

- Se reitera, por Okazaki y colaboradores, que «genes precursores de futuras pandemias por virus de la gripe se perpetúan en *patos salvajes* que anidan en Siberia» (26).
- El ya citado Webster considera que los virus que posean segmentos de genoma similares a los de los virus **H5N1** de 1997 responsables de la epizootia en pollos en Hong Kong †son *potencialmente patogénicos para los mamíferos*.

2001:

- Peiris y colaboradores entre ellos Webster (27) †dan a conocer la transmisión de virus **H9N2** *de aves a cerdos*, y la *cocirculación* con virus contemporáneos «humanos» **H3N2**.
- En ese mismo año de 2001, una publicación de Takashashi y otros 9 colaboradores (28), aparecida en el «J. Biochem. (Tokyo)», *viene a confirmar íntegramente nuestros hallazgos* (19) (dados a conocer en 1989) sobre la termoestabilidad de la sialidasa de virus de la gripe provenientes de patos salvajes, de cerdos y de humanos.

2002:

- Capua y Alexander (29) estiman que la «infección por virus

de gripe aviaria ocurre más frecuentemente que lo originariamente aceptado; pero, debido a su limitado efecto, pasa desapercibida”, †dicen literalmente; y añaden : “*El riesgo principal para los humanos es cuando la infección se produce simultáneamente por un virus aviario y un virus humano*”.

2003:

- Perez, Webster *et al.* (30) deducen que *la codorniz* aporta unas circunstancias que facilitan la adaptación de virus de la gripe procedentes de patos salvajes; lo que genera *variantes nuevas* que pueden saltar la barrera de especie.
- Por otro lado, Shortridge y colaboradores (31) indican que, aunque haya sido el Sur de China el epicentro de las pandemias de gripe, «la intensificación de la industria de las aves de corral en todo el mundo en granjas, etc., unida a la difusión de virus tales como el del subtipo H9N2, sugiere que *la génesis de una pandemia puede tener lugar en cualquier parte del mundo*. (No olvidemos la frecuencia y amplitud de los vuelos aéreos entre territorios muy alejados que se da actualmente).
- Por ello, la OMS recomienda la creación de un Comité de Seguimiento de la Gripe en cada país.

2004:

- Finalmente, en el momento actual, la gripe del pollo, además de en China, confirma su peligrosa presencia —con riesgo de expansión mayor aún— en: Japón, Laos, Taiwán, Camboya, Corea del Sur, Vietnam, Pakistán y Tailandia.

5. AGENTES ANTIGRIPALES

5.1. Vacunas

Desde 1936, el remedio más seguro —aunque no al 100 %— para prevenir la agresión gripal que cada año, especialmente en los periodos fríos, puede afectar a gran parte de la población humana, consiste en la vacunación previa.

La preparación de estas vacunas se ha ido perfeccionando considerablemente, tras varias «generaciones» de ellas, de modo que los

riesgos de trastornos secundarios a su empleo son mínimos y su eficacia muy elevada. Es sabido que deben vacunarse preferentemente las personas más expuestas por su profesión al contagio, así como los mayores de 65 años, niños, etc.

Durante las últimas temporadas, las vacunas, renovadas anualmente (como mínimo) en su composición siguiendo las oportunas indicaciones y sugerencias de los organismos de alerta internacionales, contienen cepas previsible o realmente en circulación pertenecientes a dos subtipos A (uno de ellos el H3N2 y el otro el H1N1), y una al tipo B.

¿Quiere esto decir que se halla resuelto el problema de una manera totalmente satisfactoria, aun en el caso de que se presentara una epidemia de gran amplitud y gravedad o una eventual —y nunca descartable— pandemia?

No. Piénsese, por ejemplo, en la escasez de huevos —necesarios para la preparación habitual de las vacunas— que ocurriría si se produjera una epizootia que afectara precisamente a las gallinas (a las cuales habría que sacrificar...). O, considérese la dificultad en la preparación urgente de vacunas si hubiera una pandemia, siendo el plazo requerido habitualmente de unos seis meses, el cual podría reducirse hasta unos tres meses, forzando algunas garantías no indispensables; pero difícilmente sería factible una reducción mayor de este periodo de fabricación.

Una brevísima indicación de algunos proyectos para mejorar las características y las limitaciones de dichas vacunas, además de algunos datos acerca de los antecedentes de éstas, se resume en el esquema adjunto (4, 5, 32).

VACUNAS ANTIGRIPALES

Antecedentes

Año	País	Investigador	Características
1936	Rusia	Smorodintseff	Virus vivos atenuados
1940	EE.UU	Salk	Virus inactivados
1950	Francia	I ^o Pasteur	Virus inactivados
>1950	Varios	Laboratorios	Fracciones y subunidades (HA y NA)

Proyectos de perfeccionamiento

Crecimiento de virus en **cultivos celulares**, no en huevos embrionados

Búsqueda de **adyuvantes** (>inmunogenicidad)

Vacunas por **vía oral**

Lograr **cepas atenuadas**, adecuadas

ADN desnudo

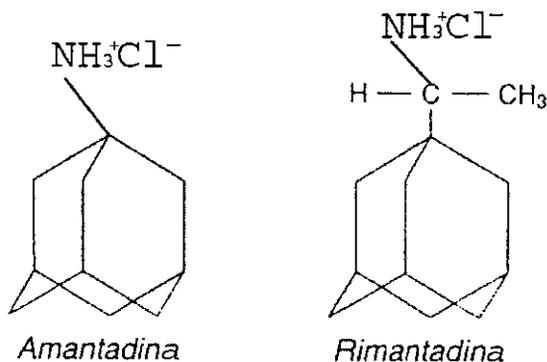
Por **genética inversa** mediante plásmidos

Cócteles con todos los subtipos de HA

Vacunas frente a la **proteína M2**.

5.2. Amantadina, rimantadina y ribavirina

En 1964, una amina primaria (cuya estructura química recuerda la de una jaula de pájaro), la **amantadina**; y, en 1965, un derivado de la misma, la **rimantadina**, fueron descritas como agentes activos frente a la neumonía de las ratas. (También se han usado para el tratamiento de otras enfermedades, en humanos).



Estos compuestos actúan, a dosis bajas, sobre la proteína M2 del virus (véase apartado 1.1), que es un canal o conducto iónico, produciendo un cambio conformacional de dicha proteína vírica, cambio que bloquea el transporte de protones que es esencial en el ciclo biológico del virus. A dosis elevadas retrasan las modificaciones conformacionales de la hemaglutinina vírica que tienen lugar a pH ácido, por lo que se impide la fusión del virus con la membrana del

endosoma, dificultándose o interrumpiéndose así el ciclo biológico de aquél.

Trastornos (aunque ligeros) como cefaleas, insomnios, etc., suelen ser causados por la amantadina; pero no (o en menor grado) por la rimantadina, salvo en algunos ancianos, quienes pueden preferir por este motivo el empleo de la primera. Ambas sólo actúan sobre virus de la gripe tipo A. Además, se han formado cepas de dicho virus resistentes a las dos.

Un estudio experimental efectuado en nuestro laboratorio (33) no ha encontrado diferencias entre las actividades sialidásicas de cepas sensibles y resistentes a la rimantadina; pero otros autores sí las han hallado. Ahora bien, ambos resultados son perfectamente compatibles ya que esta enzima no tiene forzosamente que ser afectada por los complejos fenómenos propios de la resistencia vírica.

En cuanto a la **ribavirina**, nucleósido que es la carboxamida del ribofuranosil-triazol (comercialmente registrada como «virazol»), se sabe que bloquea la biosíntesis del guanosín-5'-monofosfato, inhibiendo la biosíntesis del ARN (y del ADN), comportándose como un agente anti-transcripción primaria.

Aun siendo activa frente a los virus de la gripe tipos A y B (a diferencia de las dos aminas antes indicadas), no presenta ventajas sobre ellas, ni, obviamente, sobre las vacunas; por lo que su uso, o no está autorizado (según los países) o está desaconsejado, dados los efectos secundarios desfavorables que además podría ocasionar.

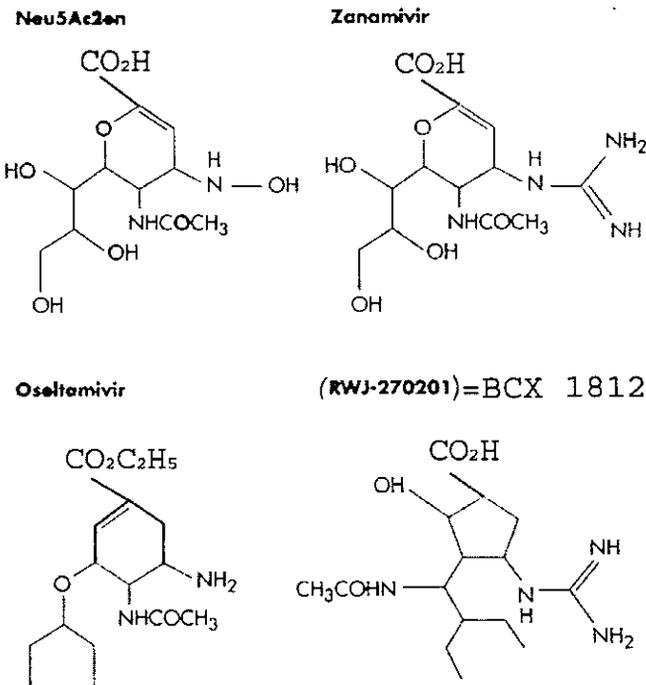
5.3. Inhibidores de la sialidasa (o neuraminidasa) de los virus de la gripe tipo A o B

En la década de 1970, numerosos trabajos de diversos Centros % también de nuestro laboratorio (34)% mostraron que el propio ácido *N*-acetilneuramínico y, sobre todo, análogos estructurales del mismo como el **ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-*N*-acetilneuramínico** (abreviadamente conocido como **Neu5Ac2en**), inhibían la actividad sialidásica de algunos virus (no solamente del causante de la gripe), la de ciertas especies de bacterias y la de mamíferos. (Tal efecto inhibitor puede comprenderse fácilmente al observar que su estructura química es coincidente con la del compuesto de transición a que da origen la actividad sialidásica sobre el sustrato en que participa el ácido *N*-acetilneuramínico).

Excepto algún derivado fluorado de éste último ácido —que no podría usarse dada su toxicidad—, los restantes análogos estructurales del mismo mostraron un poder inhibitor débil; lo que les privaba de ser agentes antigripales.

Pero, desde que en 1983 se determinó con total precisión la estructura tridimensional de la sialidasa del virus de la gripe tipo A y se conoció la naturaleza de los aminoácidos de su sitio activo, se han podido predecir (mediante uso de ordenadores, etc.) las estructuras que podrían ser más adecuadas como potenciales inhibidores de esta actividad y, por ello, agentes antigripales que bloquearían el ciclo biológico del virus.

En este sentido, han destacado el derivado guanídico llamado **zanamivir** (comercialmente registrado como «relenza») y el denominado **oseltamivir** (comercialmente, «tamiflú»). Éste presenta el grupo $-\text{COOH}$ del anterior transformado en éster, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, además de otras modificaciones estructurales (35). Otro compuesto, más reciente que los anteriores y de características intermedias en cuanto a hidrofobicidad, aún en estudio (35), es el conocido como **BCX 1812**, o también como RWJ-270201.



Siendo zanamivir y oseltamivir agentes inhibidores que actúan por un mecanismo similar (pero no forzosamente en el mismo punto del sitio activo de la sialidasa), ambos son activos frente a virus de la gripe tipo A y también sobre el B (a diferencia de las aminos antes indicadas), si bien el primero sólo puede administrarse en forma de aerosol (lo que complica su manejo en asmáticos, algunos ancianos y niños), mientras el segundo puede usarse en forma de comprimidos, por poder atravesar sin alteración la barrera digestiva.

A su vez, ambos deben ser administrados para ser eficaces en las 48 horas primeras de la infección gripal, al igual que sucede con la amantidina y la rimantadina. La necesidad de un diagnóstico temprano de la gripe, diferenciándola de catarros, etc., para el mejor rendimiento de todos ellos, constituye una limitación evidente.

No obstante, estos inhibidores de la sialidasa, lo mismo que las aminos mencionadas, son compatibles con la acreditada vacuna tradicional, a la que no tienen que reemplazar (salvo en excepcionales circunstancias por pandemias, etc.). Más bien, pueden ser agentes complementarios en la lucha y prevención de la gripe, pues también tienen acción profiláctica. Por otro lado, su relativamente elevado coste, así como el hecho de que reducen el tiempo de la duración de la enfermedad en sólo $1\frac{1}{2}$ o 2 días (según algunos autores), hacen que su utilidad sea cuestionada por ciertos organismos oficiales en las recientes campañas contra la gripe.

Dado su empleo desde hace poco tiempo, se carece de datos acerca de cepas de virus que puedan ser resistentes a los mismos.

Opiniones muy favorables acerca de la utilización de zanamivir y oseltamivir han aparecido en la revista «*The Lancet*» en el año 2000; así, el artículo de Gubareva *et al.* (35), donde se dice que ambos fármacos «representan un avance importante en el tratamiento de la gripe». También en la misma revista y el mismo año, otra publicación, limitada al oseltamivir administrado a 726 adultos, pondera las ventajas de su uso (36). (En ambos trabajos se agradece la ayuda recibida por parte precisamente de las industrias que comercializan estos productos).

Otros investigadores, en el año 2001, son coincidentes con esas opiniones favorables. Así, Elliot (37) estima que «el desarrollo de estos inhibidores de la neuraminidasa ha revolucionado las opciones del tratamiento de la gripe». También, en ese año, otros autores (38-40) sostienen que el zanamivir sirve tanto para el tratamiento como para la profilaxis de la gripe. Por su parte, Leneva *et al.* (41)

señalan un importante aspecto novedoso: que *el zanamivir es «eficaz en el tratamiento de la gripe por virus de aves que pueden ser transmitidos a los humanos»*; concretamente, los virus A (H5N1), A(H6N1) y A(H9N2).

Ya en el año 2002, se considera (42) que tanto el zanamivir como el oseltamivir son igualmente eficaces y aconsejables para su uso en los ancianos, a condición de iniciar su empleo en las 48 horas del comienzo de la infección.

Sin embargo, opiniones no tan satisfactorias también se han manifestado: Cole *et al.* (43), en 2002, estiman, en contra de otros ensayos clínicos publicados, que los «patrones de las complicaciones por gripe fueron similares en los pacientes tratados con zanamivir respecto a los no tratados». Y con más contundencia aún, se ha publicado en 2003 que «en el marco curativo, la escasa cuantía de la relación riesgo-beneficio de oseltamivir, zanamivir y amantadina constituye un argumento contra el uso de estos medicamentos» (44).

Bastan estos ejemplos para situar imparcialmente el estado de esta cuestión en el momento presente. Pero, ¿y en el futuro?

5.4. **¿Estamos preparados en Occidente para afrontar una eventual pandemia de gripe, de cualquier origen o procedencia, con los medios actualmente disponibles?**

El «Groupe d'Étude et d'Information sur la Grippe» (GEIG), francés, ha venido realizando a lo largo de las décadas de 1980 y 1990 interesantísimas reuniones anuales en diferentes ciudades europeas, en las que han participado los especialistas mundiales probablemente más destacados, así como los expertos de los organismos internacionales implicados (OMS, etc.), en relación con la gripe, analizando los medicamentos destinados a combatirla en cualquier parte del mundo, etc.

La «rencontre» n.º VII, celebraba en Berlín en septiembre de 1993 —en la que tuvo este autor ocasión de participar, invitado como lo había hecho en otras— fue dedicada preferentemente al tema: «L'Europe face au risque d'une pandémie grippale». En ella se abordaron los problemas siguientes, entre otros:

En caso de pandemia gripal:

- a) Aprovisionamiento de vacunas por cada país.
- b) Normas para su fabricación (¿se simplificarían?).

c) Categorías de preferencias en cuanto a vacunación de la población.

d) Política de utilización de los agentes antigripales.

e) Medidas de protección civil.

La acertada previsión de este estudio —ampliamente debatido en dicha reunión— se ha visto confirmada en situaciones sobrevenidas después, entre las que ha adquirido especial renombre la epizootia de pollos en Hong Kong, del año 1997, extendida después a otros lugares.

El temor a futuras epidemias /pandemias, que pudieran resultar tan mortíferas como la de 1918-19, persiste de modo justificado; pues no hay criterios para eliminar la posibilidad de su eventual aparición.

Recientemente, merced a los motivos antes apuntados y por haberse hallado nuevos datos relativos al virus de la famosa pandemia de 1918-19 —impropiamente llamada «gripe española»—, se ha reavivado el interés por este aspecto del problema. Así, Laver y Garman (45) en la prestigiosa revista «*Science*», de septiembre de 2001, publican un artículo titulado: «*The Origin and Control of Pandemic Influenza*»; del que puede ser importante entresacar párrafos como los que a continuación transcribimos (literalmente traducidos):

«Imaginad lo siguiente: En algún lugar de China, un virus de la gripe, subtipo H9N2, adquiere de repente capacidad de infectar a los humanos. El virus es altamente infeccioso y altamente transmisible, aunque la enfermedad que causa es más bien benigna. Quizá a causa de esto, se determina la identidad de la nueva cepa sólo después de que ha infectado a gran cantidad de personas en China. Algunas de éstas llevan el nuevo virus a Hong Kong, otras a Taiwán, y todavía otras a otros países. Hay una pandemia explosiva con gran trastorno social y económico [...]. Se originan rápidamente cepas en número creciente del nuevo virus, y se inicia la producción de vacunas, pero ésta progresa lentamente. Los inhibidores de la neuraminidasa “relenza” y “tamiflú” son buscados ávidamente, pero resulta escaso su suministro. ¿Quién debe disponer de estos nuevos medicamentos? Obviamente, los sanitarios y los responsables de servicios esenciales; pero, ¿quién los identificará? Se necesitan tests de diagnóstico verdaderamente rápidos, sensibles, sencillos y baratos en relación con los inhibidores de la neuraminidasa, para ser usados eficazmente por la comunidad. Además [...] es deseable que estos tests estén disponibles para su uso en las farmacias de la localidad o incluso en las casas. Un test de estas características en fase de

desarrollo por ZymeTx Inc. (Oklahoma, EE.UU.), emplea un sustrato que es específico de la neuraminidasa de la gripe, y no es escindido por la de otros virus o bacterias que probablemente estén presentes en las muestras de secreciones respiratorias. Este test, que utiliza un grupo indicador luminiscente y una película polaroid, es altamente seguro y apropiado para su empleo en las farmacias locales [...]. Otro test diagnóstico en desarrollo [...] usa tecnología de inmunoensayo óptico».

(Por otro lado, estos autores aconsejan además a los organismos gubernamentales de todos los países almacenar los nuevos medicamentos antigripales inhibidores de la neuraminidasa en grandes cantidades, con posibilidad de renovar esos depósitos cada cinco años; para mantenerlos en estado adecuado de conservación).

En relación con *el test luminiscente* (en fase de elaboración en el año 2001), creemos poder decir —con la exigible objetividad requerida— que aplica una técnica de medida de la actividad sialidásica que fue objeto de un trabajo experimental realizado en nuestro laboratorio, aplicado precisamente a virus de la gripe. Fue publicado en la revista «*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*» 365, 415-418 (1984), con el título de: «*Sialidase Assay by Luminescence in the low Picomole-Range of Sialic Acid*». En él decimos: «*This microassay, which is specific, rapid, simple and ultra-sensitive, is a measure for amounts as little as (at least) 5 pmol of N-acetylneuraminic acid [...] directly on intact virus (46)*».

A este método, de máxima sensibilidad y gran sencillez —que ahorra además el tener que extraer y purificar la enzima del virus (y así evita los riesgos de pérdida de la actividad de ésta)—, llegamos después de poner a punto otro método, paralelo, pero que hace la determinación del NADH (que es el producto final en ambos) por un procedimiento fluorimétrico (no luminiscente) (47). Su sensibilidad, inferior a la del luminiscente, es no obstante muy elevada (2 nmol de ácido siálico); y también utiliza directamente las muestras de virus, así como reactivos comercializados (no radioisotópicos).

Además, otros métodos o procedimientos —descritos ya por otros autores con anterioridad—, de considerablemente menor sensibilidad que estos dos puestos a punto por nosotros, suelen ser los de tipo espectrofotométrico (empleando sustratos que originan cromóforos muy variados), y también fueron empleados oportunamente en nuestro laboratorio (48, 49) en el estudio de la sialidasa de cepas precedentes de virus de la gripe tipos A y B.

Un año después de la publicación por Laver y Garman del trabajo antes comentado (45), un artículo aparecido en los «*Proc. Natl. Acad. Sci.*» (50) del que son autores Tumpey, García-Sastre, —discípulo y colaborador de V. Villar y de J. A. Cabezas, en Salamanca— (además de Mikulsova, Taubenberger, Swayre, Palese y Barler), resulta doblemente interesante: por haber logrado obtener virus recombinantes que contienen los segmentos de la hemaglutinina, de la neuraminidasa y de la proteína M del virus de la gripe de 1918, cuyos genes habían previamente reconstruido estos investigadores; y por la demostración de que los inhibidores de la neuraminidasa zanamivir y oseltamivir, así como los bloqueadores amantadina y rimantadina del canal iónico que es la proteína vírica M2, son eficaces tanto en cultivo de tejidos como *in vivo* (usando ratones). El título de dicho interesantísimo trabajo no puede ser más optimista: «*Existing antivirals are effective against influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus*». (Añádase a los méritos anteriores el hecho de no emplear los autores el desafortunado e inexacto apelativo de «Spanish» al referirse a la que fue tan mortífera pandemia).

Menos optimistas se muestran, un año después, Webby y Webster (51), al concluir el resumen de su valioso trabajo con la frase que dice «*our lack of preparedness for an influenza pandemic*». En este artículo, publicado en «*Science*», de noviembre de 2003, se propone que en caso de pandemia se identifiquen los subtipos H2, H5, H6 y H9, por poder ser los que más probablemente se transmitirán a los humanos desde otras especies; y, una vez más, se insiste en la importancia de las aves (principalmente los patos salvajes, pero también las domésticas de corral y granja) como reservorios de virus durante los diez años últimos. Por ello, la puesta a punto de vacunas como las obtenidas por el sistema de «genética inversa» (con genes de la hemaglutinina y la neuraminidasa), además de otras medidas como disponer de fármacos antigripales, resulta muy aconsejable, en su opinión. E insisten en que, aceptando que actualmente estamos en «mucho mejor posición para responder rápidamente a una amenaza de gripe que en 1997, mucho queda aún por hacer; pues, en conjunto, nuestro estado de preparación está lejos de ser óptimo» (51).

Finalmente, en relación con el riesgo de eventuales epidemias/pandemias de gripe, parece deducirse que, con los remedios actuales cabe la posibilidad de sentirse razonablemente optimistas. No

obstante, «no debe bajarse la guardia», sino que hay que proseguir la investigación, con imaginación creadora, en busca de nuevos remedios aún mejores, y manteniendo un permanente afán de perfeccionamiento en todo lo referente al estudio de esta plaga. Sólo así se podrá seguir avanzando de forma útil y adecuada. Si los virus (y el de la gripe ha acreditado poseer una «sutileza» extraordinaria para su permanencia) son capaces de adaptarse desde hace siglos a las circunstancias más desfavorables para ellos mediante reorganización de sus constituyentes, etc., la mente de los investigadores habrá de encontrar los remedios científicos que logren vencer esas situaciones, evitando las terribles pérdidas sufridas en épocas pasadas, no tan lejanas, y de cuyo riesgo no estamos exentos actualmente.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A. (2000): *Glicociencia: Glicobiología, Glicopatología, Glicoterapéutica, Glico(bio)tecnología*. Instituto de España. Madrid.
- (2) ROSEMAN, S. (2001): *J. Biol. Chem.* 276: 41527-41542.
- (3) KILBOURNE, E.D. (1981): *Influenza*. Plenum Med. Co. New York, NY.
- (4) HANNOUN, C. (1995): *La Grippe et ses virus*. Presses Universitaires de France. París.
- (5) GROUPE ECRIR (2002): *La Grippe: aspects actuels*. Flammarion. París.
- (6) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A. (1978): *An. R. Acad. Farm.* 44: 493-509.
- (7) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A. (1990): «Datos sobre las pandemias de gripe de 1889-90 y 1918-19 en Madrid y Salamanca, y estudios sobre la sialidasa de los virus de la gripe A y B y la esterasa del virus C». Discurso de recepción (R. Acad. Farm.) Madrid.
- (8) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A.; HANNOUN, C. (1990): *Inv. Ciencia* 159: 61-69.
- (9) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A. (1991): *Ann. Pharmaceutiques françaises* 49: 57-66.
- (10) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A.; VILLAR, E.; GARCÍA-SASTRE, A.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C. (1993): *Trends in Comparat. Biochem. Physiol.* 1: 779-800.
- (11) GARCÍA-SASTRE, A.; VILLAR, V.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C.; CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A. (1991): *Biochem. J.* 273: 435-441.
- (12) GARCÍA-SASTRE, A.; VILLAR, V.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C.; CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A. (1992): *Enzyme Nomenclature (IUB)*, pp. 313 y 616. Academic Press, Inc. New York.
- (13) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A.; VILLAR, E.; GARCÍA-SASTRE, A.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C. (1991): *Intervirolgy* 32: 325-326.

- (14) MUÑOZ-BARROSO, I.; GARCÍA-SASTRE, A.; VILLAR, V.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C.; CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A. (1992): *Virus Res.* 25: 145-153.
- (15) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A.; CALVO, P.; EID, P.; MARTÍN, J.; PÉREZ, N.; REGLERO, A.; HANNOUN, C. (1992): *Enzyme Nomenclature (IUB)*, pp. 348-594. Academic Press, Inc. New York.
- (16) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A.; CALVO, P.; EID, P.; MARTÍN, J.; PÉREZ, N.; REGLERO, A.; HANNOUN, C. (1980): *Biochim. Biophys. Acta.* 616: 228-238.
- (17) MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C.; SAENZ, M.C.; VILLAR, E.; CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A. (1994): *Europ. J. Epidemiol.* 10: 91-94.
- (18) MANUGUERRA, J.C.; HANNOUN, C.; SIMÓN, F.; VILLAR, E.; CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A. (1993): *Microbiologica* 16: 367-371.
- (19) FIZSON, B.; HANNOUN, C.; GARCÍA-SASTRE, E.; VILLAR, V.; CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A. (1989): *Res. Virol.* 140: 395-404.
- (20) SUBBARAO, K.; KATZ, J. (2000): *Cell Mol. Life Sci.* 57: 1720-1784.
- (21) BANKS, J.; SPEIDEL, E.; ALEXANDER, D. J. (1998): *Arch. Virol.* 143: 781-787.
- (22) KATZ, J.M. [et al.]; COX, N.J. (1999): *J. Infect. Dis.* 180: 1763-1770.
- (23) KATZ, J.M. (2003): *Avian Dis.* 47: 914-920.
- (24) MITROSOVICH, M.; ZHOU, N.; KAWAOKA, X.; WEBSTER, R.G. (1999): *J. Virol.* 73: 1146-1155.
- (25) SUBBARAO, K.; SHAW, M.W. (2000): *Rev. Med. Virol.* 10: 337-348.
- (26) OKAZAKI, K. [et al.] (2000): *Arch. Virol.* 145: 885-893.
- (27) PEIRIS, J.S. [et al.]; WEBSTER, R.G. (2001): *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2723-2732.
- (28) TAKASHASHI, T. [et al.] (2001): *J. Biochem (Tokyo)* 130: 279-283.
- (29) CARUA, I.; ALEXANDER, D.J. (2002): *Acta Trop.* 83: 1-6.
- (30) PÉREZ, D.R., [et al.]; WEBSTER, R.G. (2003): *J. Virol.* 77: 3148-3156.
- (31) SHORTRIDGE, K. F.; PEIRIS, J.S.; GUAN, Y. (2003): *J. Appl. Microbiol.* 94: 70S-79S.
- (32) HANNOUN, C. (1999): *La Vaccination.* Presses Universitaires de France. París.
- (33) GARCÍA-SASTRE, A.; VILLAR, E.; HANNOUN, C.; CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A. (1990): *Enzyme* 47: 207-211.
- (34) CABEZAS, M. (1978): *Int. J. Biochem.* 9: 47-49.
- (35) GUBAREVA, L.V.; KAISER, L.; HAYDEN, F.G. (2000): *Lancet, The*, 355: 827-835.
- (36) NICHOLSON, K. G.; AOKI, F.Y., [et al.] (2000): *Lancet, The*, 355: 1845-1850.
- (37) ELIOTT, M. (2001): *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 356: 1885-1893.
- (38) GRAVENTSTEIN, S.; JOHNSTON, S.L.; LOESCHEL, E.; WEBSTER, R.G. (2001): *Drug Saf.* 24: 1113-1125.
- (39) COX, R. J. et al. (2001): *Vaccine* 19: 4743-4749.
- (40) HIRJ, Z., et al. (2002): *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 23: 604-608.
- (41) LENEVA, I.A.; GOLOUBEVA, D.; FENTON, R.J.; TISDALE, M.; WEBSTER, R.G. (2001): *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1216-1224.

- (42) DUMYATI, G.; FALSEY, A.R. (2002): *Drugs Ageing* 19: 777-786.
- (43) COLE, J.A. *et al.* (2002): *Clin. Ther.* 24: 1824-1839.
- (44) — (2003): *Prescriptive Int.* 12: 85-88.
- (45) LAVER, G.; GARMAN, E. (2001): *Science* 293: 1776-1777.
- (46) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A.; PÉREZ, N.; LLANILLO, M.; REGLERO, A., CALVO, P. (1984): *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365: 415-418.
- (47) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A.; REGLERO, A.; HANNOUN, C. (1983): *Anal. Biochem.* 131: 121-126.
- (48) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A.; CALVO, P.; EID, P.; MARTIN, J.; PÉREZ, N.; REGLERO, A.; RODRIGO, M.; HANNOUN, C. (1982): *Int. J. Biochem* 14: 311-319.
- (49) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J.A.; REGLERO, A.; CALVO, P. (1983): *Int. J. Biochem.* 15: 243-259.
- (50) TUMPEY, T.M.; GARCÍA-SASTRE, A.; MIKULASOVA, A.; TAUBENBERGER J.K.; SWAYNE, D.E.; PALESE, P.; BASLER, C.F. (2002): *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 13894-13854.
- (51) WEBBY, R.J.; WEBSTER, R.G. (2003): *Science* 302: 1519-1522.