

Revisión

Mecanismos de patogenicidad y adaptabilidad humana de las cepas gripales aviarias A (H5N1)

J. Reina¹ y R. Ortiz de Lejarazu²

¹Centro de Referencia de la Gripe Illes Balears, Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca;

²Centro Nacional de Gripe de Valladolid, Hospital Clínico Universitario, Facultad de Medicina, Valladolid y Grupo de Estudio de la Gripe (GEG)

La gripe aviaria, también llamada peste aviaria, es una enfermedad infecciosa causada por el virus gripal aviar tipo A, que afecta preferentemente y en forma de brotes epidémicos a las diferentes especies de aves y en menor medida a los cerdos. Aunque la mayoría de las especies aviarias son susceptibles a este virus, las aves domésticas lo son muy especialmente y en ellas se producen brotes epidémicos masivos. La enfermedad aviaria se presenta en dos formas clínicas: una leve o moderada, que se caracteriza básicamente por una escasa mortalidad y en especial por una importante reducción en la producción de huevos, y otra forma grave, reconocida por primera vez en Italia en 1878, caracterizada por su elevada contagiosidad y mortalidad, que alcanza cifras del 80% al 100% (1-4).

Las dos formas clínicas de la gripe aviaria están causadas por dos tipos distintos de cepas del virus. La forma leve la producen las cepas designadas de baja patogenicidad o LPAI (*Low Pathogenic Avian Influenza*), mientras que las formas letales están causadas por las cepas de elevada patogenicidad o HPAI (*High Pathogenic Avian Influenza*) (4, 5). La diferencia entre ellas se puede establecer inicialmente mediante la subtificación; hasta la fecha, los úni-

cos subtipos que han mostrado el carácter HPAI han sido el H5 y el H7. Además de la subtificación, es necesario demostrar *in vivo* la letalidad de las cepas, para lo cual éstas se inoculan por vía intravenosa en pollos de 4 a 6 semanas, y si producen la muerte del 75% de los animales son consideradas cepas HPAI. Finalmente, es conveniente realizar el secuenciado génico o de aminoácidos del gen de la hemaglutinina, en especial en la zona designada como péptido conexión, y comprobar la sustitución de los aminoácidos normales por otros de tipo básico. Estos cambios, debidos a mutaciones concretas acumuladas, facilitan que cualquier proteasa del organismo pueda activar la hemaglutinina y se produzcan infecciones diseminadas con elevada tasa de mortalidad. En las cepas humanas y aviarias LPAI la hemaglutinina sólo puede ser activada por las proteasas del aparato respiratorio y, por lo tanto, sólo se producen fenómenos patológicos en este territorio orgánico (4, 5).

Actualmente estamos viviendo una pandemia de gripe aviaria causada de nuevo por una cepa A (H5N1) del tipo HPAI que afecta a más de diez países del sudeste asiático. Aunque su origen no está confirmado, parece que podría haber sido en el sur de China; se inició oficialmente en Corea

del Sur (diciembre de 2003) y se ha extendido rápidamente a la mayoría de los países circundantes (6, 7). La forma tan rápida de expansión de esta gripe entre las aves domésticas no se había observado previamente y hace pensar en una cepa H5N1 con elevada capacidad de infección, difusión y alta resistencia a las condiciones ambientales.

En estos momentos, las cepas H5N1 deben ser consideradas como endémicas entre las aves terrestres asiáticas, en donde han conquistado un nuevo nicho ecológico del que probablemente va a ser imposible erradicarlas. Además de ello, debe tenerse en cuenta que las cepas gripales humanas H3N2 son, así mismo, endémicas entre la población porcina del sudeste de China, de modo que existe una elevada probabilidad de que se produzcan fenómenos de intercambio o reordenamiento génicos entre estos dos subtipos de cepas gripales, con la posible aparición de una cepa con elevada capacidad para infectar al ser humano, por lo que es muy importante un rápido control de los brotes locales de infección aviaria en las zonas asiáticas causados por las cepas H5N1 de elevada patogenicidad (7-9).

Las cepas aviarias H5N1 que hasta ahora se habían aislado en las aves salvajes (patos, gaviotas) eran consideradas de baja patogenicidad, al igual que el resto de los subtipos que albergan. En la actualidad se ha comprobado que estas cepas se transmiten a las aves de corral (terrestres), que se infectan de una forma muy eficiente. En estas aves (nuevo huésped) dichas cepas desarrollan una serie continua de mutaciones espontáneas que afectan preferentemente a la hemaglutinina y en particular a la zona de activación proteolítica (péptido conexión), dando lugar a cepas H5N1 consideradas de alta patogenicidad o virulencia. Estas cepas difunden y se diseminan rápidamente entre las aves terrestres, produciéndose grandes epidemias de elevada mortalidad. Recientemente se ha comprobado que las cepas H5N1 de alta patogenicidad de los pollos pueden transmitirse eficientemente a los patos domésticos, y sobre todo a los patos y aves salvajes, que las incorporarían a su población gripal propia (portadores), convirtiéndose en los agentes de su diseminación mundial por las diferentes rutas migratorias. De esta forma queda demostrado el fenómeno de que las cepas H5N1 de alta patogenicidad no se han originado en las aves salvajes (cepas endógenas), sino que las han incorporado externamente (cepas exógenas) tras su contacto con las aves terrestres (origen de ellas) (9-13).

La aparición de una cepa gripal con potencial pandémico puede deberse a dos fenómenos biológicos distintos. Uno de ellos es mediante el intercambio génico (proceso de reordenamiento) entre cepas gripales de diferentes especies animales (aviarias y humanas, por ejemplo). En este proceso se obtendría una cepa nueva que contendría ge-

nes de ambas especies, con capacidad de infección humana y características antigénicas aviarias, frente a la cual el ser humano carecería de memoria inmunitaria. La segunda posibilidad, genética y evolutivamente más lenta, es la acumulación progresiva de una serie de mutaciones espontáneas (mutaciones adaptativas) que irían facilitando no sólo el incremento de la virulencia de la cepa sino además, y mucho más importante, su capacidad para infectar eficientemente al ser humano. En este caso, la cepa pandémica contendría todos los genes de la especie original, tal y como parece que ocurrió en la cepa gripal A (H1N1) causante de la pandemia de 1918 (gripe española) (14, 15).

Uno de los interrogantes actuales es por qué el subtipo H5N1 aviario no ha intercambiado todavía sus genes con las cepas gripales humanas. Debido a la amplia distribución aviaria de esta cepa, ya endémica en el sudeste asiático, y al continuo contacto con seres humanos, parecería que se están dando las condiciones ecológicas y epidemiológicas óptimas para que se produjera este fenómeno, y a pesar de ello ninguna cepa aislada en personas infectadas presenta todavía genes gripales humanos. ¿Es posible que no pueda realizar este proceso biológico o es que los resultados no han sido viables, o han resultado ineficientes en cuanto a capacidad infectiva o escasamente patogénicos? (16-18) Los datos disponibles en estos momentos parecen indicar que las cepas gripales aviarias H5N1 están desarrollando y acumulando una serie de mutaciones adaptativas en diferentes genes, que les van confiriendo una mayor capacidad de infección para los mamíferos, incluyendo la especie humana (16-20).

EVOLUCIÓN DE LOS GENOTIPOS GRIPALES AVIARIOS

Desde el año 2001 las cepas gripales aviarias tipo A subtipo H5N1 se han mantenido en constante circulación en toda China, con un patrón estacional de picos máximos en octubre y marzo, cuando la temperatura ambiental está por debajo de 20 °C. La capacidad de supervivencia y viabilidad de estas cepas aumenta durante los periodos de bajas temperaturas. Durante el año 2000 las cepas H5N1 se aislaron exclusivamente de las aves acuáticas; sin embargo, a partir de 2001 se pudieron aislar tanto de las aves acuáticas como de las terrestres, aunque la tasa de aislamiento permaneció mucho más alta en las salvajes (ánades) (7-9). Los análisis filogenéticos de los genes de las cepas aviarias aisladas a partir de ese año han demostrado que tienen distinto origen. Así, los genes encargados de codificar la hemaglutinina (gen 4) y la neuraminidasa (gen 6) derivaban siempre de la línea genética Goose/Guangdong/1/96 (Gs/Gd), causante de la epidemia humana de 1997. Los otros seis

Tabla 1. Evolución de los genotipos de las cepas H5N1 aviarias en Asia.

Año	Genotipos
1999	Gs/Gd
2000	Gs/Gd, C
2001	A, B, C, D, E, X ₀
2002	Z, Z ⁺ , Y, B, W, X ₀ -X ₃
2003	Z, Z ⁺ , V
>2004	Z

genes procedían filogenéticamente de múltiples orígenes, a través de diferentes procesos de intercambio genético (reordenamiento). Estos datos se utilizan como base para establecer o definir los diferentes genotipos de los virus gripales aviarios A H5N1 aislados. Hasta el año 2001 se habían aislado y caracterizado seis reordenamientos o genotipos H5N1, correspondientes a los genotipos A, B, C, D, E y X₀ (Tabla 1). Estas cepas aviarias se habían aislado preferentemente de las aves acuáticas salvajes y por primera vez en 1997 también de las aves terrestres (21, 22).

Desde el año 2002 se han ido detectando ocho nuevos genotipos en las cepas aviarias H5N1 (genotipos V, W, X₁, X₂, X₃, Y, Z y Z⁺), habiendo sustituido definitivamente a todos los genotipos anteriores A, C, D y E, y a su precursor común (Gs/Gd). Este cambio brusco parecía sugerir que los nuevos genotipos habían adquirido una ventaja selectiva de supervivencia que les facilitaba enormemente su adaptación ambiental y animal. De este modo, durante todo 2002 estuvieron circulando conjuntamente en China ocho genotipos distintos de las cepas aviarias H5N1. Una de las características más interesantes de todos los genotipos hasta ahora conocidos, excepto el precursor Gs/Gd y los X₀-X₃, es que presentan una delección de cinco aminoácidos en las posiciones 80 a 84 de la proteína NS1. Del mismo modo, todos los genotipos aislados a partir de 2002, excepto B, W y Z⁺, presentan una delección de 20 aminoácidos en la parte común o troncal de la neuraminidasa, entre las posiciones 49 y 68. Este tipo de delección se asocia patogénicamente con el proceso de adaptación progresiva de los virus gripales aviarios salvajes a las aves terrestres (23, 24).

Desde enero de 2002, el genotipo Z, que contiene ambos tipos de delecciones, se ha convertido en el sur de China en el dominante y predominante en las cepas aviarias H5N1, tanto salvajes como terrestres (25, 26). En febrero de 2003 se comunicaron los primeros casos de infecciones humanas, desde el brote de diciembre de 1997, causados por la cepa

gripal aviaria H5N1. Los estudios moleculares y filogenéticos realizados sobre las cepas H5N1 humanas (A/Hong Kong/212/03 y A/Hong Kong/213/03) mostraron que presentaban la misma constelación de genes que definen al genotipo Z, pero carecían de la delección troncal en la neuraminidasa, siendo designadas estas cepas como genotipo Z⁺ (27). A partir de ese momento, todas las cepas H5N1 causantes de brotes aviarios epidémicos a finales de 2003, 2004 y 2005 en Indonesia, Tailandia y Vietnam han demostrado su pertenencia constante al genotipo Z (25, 26).

Los estudios filogenéticos realizados sobre otros genes gripales han demostrado un proceso evolutivo similar al descrito para la hemaglutinina. Así, los genes M y NS son muy semejantes a los de los múltiples subtipos de cepas aisladas en los patos del sudeste de China, lo que sugiere que las cepas aviarias acuáticas son las donantes de los genes en las nuevas cepas dominantes. Los procesos de transmisión e intercambio genético bidireccionales entre cepas aviarias acuáticas y terrestres se han confirmado como causa de la aparición de la cepa reordenada H9N2 (28), de modo que es muy probable que este mismo mecanismo también haya determinado la generación de la cepa aviaria H5N1. Lo que llama la atención es que en poco tiempo, desde la aparición en 2002 del genotipo Z, éste haya reemplazado y desplazado al resto de los genotipos (A-E, X e Y), siendo actualmente el dominante en las cepas H5N1, tanto acuáticas como terrestres, en las zonas endémicas de China. A pesar de ello, los estudios de constelación génica parecen demostrar que el genotipo Z aviario salvaje todavía no está adaptado por completo a las aves terrestres, con lo cual existe la posibilidad de que continúe evolucionando mediante mutaciones adaptativas o procesos de intercambio genético hasta alcanzar una mayor eficacia o ventaja selectiva (29).

RESTRICCIÓN DE HUÉSPED

Los diferentes estudios epidemiológicos y ecológicos han demostrado que todas las cepas gripales se originan y mantienen en una población animal concreta, las aves acuáticas. A partir de ellas, que actúan como reservorio natural, estas cepas se transmiten a otros animales (aves domésticas, cerdos, caballos, mamíferos acuáticos y hombres) (2, 30, 31). Aunque es frecuente la transmisión interespecies, parece existir una importante restricción de huésped que delimita biológicamente este proceso (1, 31). En términos generales, las cepas aviarias no se replican eficientemente en los seres humanos ni en los primates (32, 33); de forma análoga, las cepas humanas no se desarrollan en los anádes (34, 35). Algunos estudios parecían haber demostrado la

necesidad de una adaptación previa de las cepas aviarias al cerdo para posteriormente ser capaces de infectar al ser humano (36, 37), pero el brote epidémico de Hong Kong (H5N1) en 1997 demostró la posibilidad de infección directa de las aves al ser humano a pesar de la posible restricción de huésped existente entre las dos especies (36-38).

Todavía no se conocen con exactitud cuáles son todos los factores que establecen de forma específica esta restricción de huésped, pero sí parece claro el papel de una de las dos glucoproteínas de superficie (hemaglutinina) de las cepas gripales y los diferentes compuestos químicos que configuran el receptor celular de las células huésped (30, 31).

La hemaglutinina se constituye como el principal factor limitante del espectro infectivo de las cepas gripales, en tanto que es la encargada del reconocimiento del huésped (1, 31). La especificidad (y composición) del receptor celular para las cepas gripales varía en función del origen animal de las células. En los seres humanos, las cepas gripales reconocen preferentemente los receptores que contienen sialiloligosacáridos terminados con un ácido N-acetilsialico unido a una galactosa mediante un enlace de tipo $(\alpha 2,6)(\text{NeuAc}\alpha 2,6\text{Gal})$ (39-42). Por otro lado, las cepas gripales aviarias y equinas reconocen preferentemente el receptor formado por un ácido N-acetilsialico unido a una galactosa mediante un enlace de tipo $(\alpha 2,3)(\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal})$ (42-44). Como consecuencia de ello, las diferentes cepas gripales infectan distintos tejidos orgánicos en las diversas especies en función del predominio o la presencia de estos tipos de receptores celulares. Así, las células del epitelio respiratorio humano contienen predominantemente restos de $\text{NeuAc}\alpha 2,6\text{Gal}$ (76), mientras que las vías respiratorias de los caballos y el tracto intestinal de los patos (en donde se replican las cepas aviarias) contienen sobre todo restos de $\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}$ (46). Curiosamente, el aparato respiratorio de los cerdos contiene ambos tipos de receptores, lo cual explica la susceptibilidad de estos animales tanto a las cepas aviarias como a las humanas (45-48). Así pues, uno de los factores que determinan la susceptibilidad o restricción de huésped para las cepas gripales es la presencia de estos restos sialicos en las diferentes células y tejidos de cada especie animal. Por parte de la cepa gripal, estas diferencias de especificidad vienen determinadas básicamente por la estructura y secuencia de la zona de la hemaglutinina implicada en la unión al receptor celular. La presencia de leucina en la posición 226 del subtipo humano H3, en vez de glicina como tienen las cepas aviarias y equinas, le confiere especificidad para unirse al receptor formado por la $\text{NeuAc}\alpha 2,6\text{Gal}$ (47, 48). Los diferentes estudios han de-

mostrado cómo la secuencia de aminoácidos en el bolsillo del punto de fijación al receptor celular de la subunidad proteica HA1 (posiciones Gln 222 y Gly 224) determina la afinidad de la cepa gripal por los receptores celulares de tipo aviario (2,3- NeuAcGal). Recientemente se ha detectado la sustitución Ser227Asn en cepas H5N1 aisladas en dos pacientes tras su visita a la región de Fujian, pero no en el resto de las cepas analizadas (49).

Además de la hemaglutinina, parece que en las cepas aviarias H5N1 la restricción del huésped también viene determinada por diferentes mutaciones en el gen PB2. De este modo, las mutaciones que afectan a la posición 627 de esta proteína contribuyen a determinar el espectro de huésped de las cepas gripales. Todas las cepas aviarias presentan Glu (ácido glutámico) en esta posición, mientras que todas las cepas humanas (H1N1, H2N2 y H3N2) poseen Lys (lisina). Por lo tanto, la aparición de Lys en esta posición en una cepa aviaria se considera un paso de adaptación (mutación adaptativa) a las células de los mamíferos; por ahora sólo se ha detectado en cepas aviarias aisladas de seres humanos o en aquellas previamente adaptadas a las líneas celulares humanas (38, 50). En el estudio experimental realizado por Li y cols. (49) se ha observado que cerca del 50% de las cepas H5N1 recuperadas de los pulmones de ratón (postinfección) presentaban la sustitución de Glu por Lys.

Por otro lado, las mutaciones en la posición 701 del gen PB2 parecen determinar o favorecer la capacidad de las cepas gripales aviarias para cruzar la barrera de especie y replicarse en los mamíferos. El marcador aminoácido consiste en la adquisición (mutación/sustitución) de Asn (asparagina) en vez de Asp (ácido aspártico) (Asp701Asn) en dicha posición (51). Este tipo de sustitución ya se había observado en las cepas aviarias H7N7 adaptadas a las líneas celulares de pulmón de ratón y en cepas humanas adaptadas al ratón (52). El aspecto más importante es que mientras la incorporación de Lys en la posición 627 de la PB2 es una mutación dependiente del huésped, la sustitución Asp701Asn es una mutación independiente de éste, que se produce de forma normal y espontánea en las cepas gripales H5N1 de los patos, facilitando la transmisión de estas cepas a los mamíferos. Debe tenerse en cuenta que todos estos estudios se han realizado en modelos murinos, de modo que su verdadera significación en las infecciones humanas por cepas aviarias no está del todo establecida. Parece evidente que el proceso de adaptación de las cepas aviarias a las células de mamíferos es un fenómeno poligénico (constelación genética), en el cual el gen PB2 es uno de los esenciales tanto para la patogenia (posición 627) co-

mo para el espectro de huésped (posición 701), al menos en las cepas aviarias H5N1 que son capaces de infectar al ratón (factor de virulencia) (38, 49).

El gen de la hemaglutinina parece presentar una especial relación evolutiva con el gen M (proteína de matriz). El gen M es un importante determinante de la especificidad de especie. Codifica dos proteínas parcialmente solapadas: la M1 de 252 aminoácidos y altamente conservada, y la M2 de 97 aminoácidos. La evolución del gen M parece reflejar la adaptación específica de huésped del virus, debido a que probablemente no está sujeto a una fuerte presión selectiva por el sistema inmunitario (53). Estudios recientes demuestran que la proteína M2 requiere mayor presión selectiva que la M1 para evolucionar genéticamente (54). El hecho de que en los pollos los virus presenten un mayor número de variaciones en su secuencia de aminoácidos que en su reservorio natural (aves acuáticas salvajes) apoya la teoría de la evolución estática de los virus gripales en el reservorio natural (sin evidencia de una evolución real en los últimos 60 años), y la rápida aparición y acumulación de mutaciones una vez infectadas otras especies animales, especialmente en las glucoproteínas de superficie como consecuencia de la intensa presión selectiva del sistema inmunitario. La elevada divergencia en las secuencias de las M2 de diferentes huéspedes confirma la evolución independiente de las proteínas M1 y M2 (53, 54).

En el hombre, los virus gripales humanos se replican en las células epiteliales ciliadas del aparato respiratorio (45). En estas células se ha detectado la mayor presencia de los receptores humanos anteriormente mencionados. En un estudio de Matrosovich y cols. (55) se refiere la detección de receptores (α 2-6) en las células epiteliales no ciliadas del árbol respiratorio humano y se confirma la presencia de receptores (α 2-3) en las células epiteliales ciliadas. Así pues, las células no ciliadas parecen ser la diana de los virus gripales aviarios en el huésped humano. También se ha observado que en las fases finales de una infección gripal por cepas aviarias las células epiteliales ciliadas se hacen permisivas tanto para los virus humanos como para los aviarios, favoreciendo la posibilidad de coinfecciones y procesos de intercambio génico entre ellos. Este estudio abre la posibilidad de que las cepas aviarias puedan replicarse eficientemente en las células conjuntivales del ser humano que también presentan receptores epiteliales con enlaces de tipo (α 2-3). Este dato apoyaría la epidemia de conjuntivitis causada por la cepa aviaria H7N7 en Holanda y la posibilidad de infección conjuntival por parte del subtipo H5N1 (56, 57).

Existen pocos estudios sobre el análisis de la replicación y localización del virus aviario H5N1 en seres humanos.

Recientemente, Uiprasertkul y cols. (58) han estudiado la presencia del genoma viral del H5N1 (mediante RT-PCR) en diferentes localizaciones orgánicas de un paciente fallecido. Han observado cómo la replicación viral no sólo se produce en las vías respiratorias sino también, y con gran intensidad, en el tracto gastrointestinal. Se confirma en su estudio que el parénquima pulmonar es el principal órgano afectado por el virus gripal aviario, y que el virus infecta preferentemente los neumocitos tipo II y no las células epiteliales columnares. Los neumocitos tipo II son células productoras de sustancia tensioactiva y presentan grandes cantidades de ácido siálico en su superficie celular (receptor viral). La no detección (ausencia) de antígenos virales en la tráquea parece indicar que las vías respiratorias altas no actúan como principal sitio de replicación viral activa. Este dato contrasta con lo observado en los virus gripales humanos, para los que las vías respiratorias altas y la tráquea son sus principales zonas de replicación. De este modo, la predilección del virus gripal aviario H5N1 por las vías respiratorias bajas explicaría la dificultad inicial para el diagnóstico rápido (detección antigénica y RT-PCR) en los aspirados nasofaríngeos y frotis nasales, por lo que se recomienda, ante la sospecha clínica, recurrir a muestras de mayor calidad (lavado o aspirado broncoalveolar) (58).

La presencia del virus aviario H5N1 en la mucosa gastrointestinal humana (aunque sin alteraciones inflamatorias) contrasta con la escasa afectación por parte de los virus gripales humanos H3 y H1, y podría reflejar simplemente la excreción intestinal de los virus respiratorios deglutidos. Se han comunicado casos de pacientes infectados por el H5N1 que presentaron diarrea antes o durante el proceso respiratorio. Con estos nuevos datos debe considerarse la posibilidad de la excreción fecal de virus activos y que la ruta fecal pueda ser de cierta eficiencia en la diseminación y transmisión persona-persona del virus aviario H5N1 (58, 59).

EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

La mayoría de las cepas H5N1 de genotipo Z aisladas desde 2002 se caracterizan por haber adquirido la capacidad para la N-glicosilación de las posiciones 154-156 en la hemaglutinina. La glicosilación en este punto de la estructura globular de la H5, adyacente al de fijación al receptor celular y a los determinantes antigénicos, puede provocar alteraciones en la capacidad de unión a otros receptores celulares (especificidad de huésped) y permitir a los virus evadir la respuesta inmunitaria (60, 61) (Tabla 2).

Diversos estudios parecen indicar que en algunas cepas (H5N1/97) el gen NS confiere resistencia a los efectos antivirales del interferón (IFN) y al factor de necrosis tumo-

Tabla 2. Factores de virulencia de las cepas aviarias A (H5N1).

	Cambio/mutación	Gen/proteína
Activación proteasas	Péptido conexión AAbs	Hemaglutinina
Unión receptor	Ser227Asn	HA1 (<i>pocket</i>)
Evasión respuesta inmunitaria	N-glycos 154-156	Hemaglutinina
Virulencia ratón	Lys627	PB2
Adaptación células mamíferos	Asp701Asn	PB2
Virulencia cerdo	Glu92	NS1
Respuesta hipercitocínica	Glu92	NS1

ral alfa (TNF- α), por la presencia de Glu en la posición 92 de la NS1. El gen NS codifica dos proteínas, y de ellas la NS1 es la que participa en la exportación nuclear de proteínas. La NS1 contribuiría a la patogenicidad viral permitiendo al virus inactivar (efecto antagonista) las defensas del huésped mediadas por el IFN. La inserción del gen NS1 de la cepa H5N1/97 en una cepa no patógena (A/PR/8/34) determina un incremento significativo de la patogenicidad en la cepa receptora. De este modo, se ha observado que las cepas aviarias y humanas H5N1 presentan una mayor capacidad y potencia que las humanas H3 y H1 para la inducción de citocinas proinflamatorias, tales como la proteína inducible 10 (IP10) y el TNF- γ , en los macrófagos humanos; todo ello determinaría una tormenta de citocinas y la muerte del huésped sin necesidad de diseminación viral extrapulmonar (62, 63).

VIRULENCIA EN LOS MAMÍFEROS

La presencia de Lys 627 en vez de Glu en la proteína PB2 se ha relacionado con un incremento en la virulencia de las cepas aviarias H5N1 en el ratón y de las cepas aviarias H7N7 en los seres humanos (38). Esta posición determina la eficiencia de la replicación viral en el ratón, pero no en las aves, aunque no determina ni participa en el establecimiento del tropismo por los diferentes tejidos murinos. Parece evidente que la patogenicidad para el ratón es un proceso complejo en el cual participa una constelación genética múltiple. Tres de las cuatro cepas H5N1 aisladas en seres humanos en Vietnam presentan este tipo de mutación, pero no las cepas humanas de Tailandia (49).

La presencia de una asparagina (Asp701Asn) en la posición 701 de la PB2 es muy poco frecuente en la mayoría de las cepas gripales aviarias normales, e incluso en las cepas del subtipo H5N1 (64), aunque es muy frecuente encontrarla en las cepas gripales equinas (65), porcinas (66) y humanas H5N1 (51). Esta mutación ya había sido observada en las cepas aviarias H7N7 adaptadas a una línea ce-

lular de pulmón de ratón (51) y en las cepas gripales humanas adaptadas al ratón (52).

No se ha encontrado todavía ninguna cepa aviaria ni humana H5N1 con la presencia de Glu 92 en la proteína NS1, lo cual se ha relacionado con un incremento de la virulencia para el cerdo, aunque sí hay datos serológicos de la infección asintomática de estos animales en la pandemia aviaria del sudeste asiático (62, 67).

En resumen, de los datos disponibles puede extraerse la conclusión de que las cepas gripales aviarias H5N1, tras haberse convertido en cepas de alta patogenicidad, lo que les ha permitido infectar de forma masiva a las aves terrestres, están incorporando una serie de mutaciones adaptativas, en particular en los genes de la hemaglutinina y PB2, que les confieren progresivamente la capacidad para infectar a los mamíferos, incluyendo a la especie humana. Esta capacidad todavía es muy limitada y la transmisión de persona a persona parece ser un proceso muy poco eficiente. Sin embargo, si no disminuimos la elevada población aviaria en que predomina este subtipo, sólo es cuestión de tiempo y oportunidades el que vaya adquiriendo, de manera lenta pero progresiva, esta eficiencia infectiva en los humanos. No obstante, nunca puede descartarse la posibilidad de un intercambio genético inesperado con otras cepas gripales de distintas especies.

Correspondencia: Dr. Jordi Reina, Centro de Referencia de la Gripe Illes Balears, Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta, c/Andrea Doria nº 55, 07014 Palma de Mallorca. e-mail: jreina@hsd.es

BIBLIOGRAFÍA

1. Ito, T., Kawaoka, Y. *Avian influenza*. En: Nicholson, K.G., Webster, R.G., Hay, A.J. (Eds.). *Textbook of influenza*. Blackwell Science, Oxford 1998; 126-136.

2. Murphy, F.A., Gibbs, E.P., Horzinek, M.C., Studdert, M.J. *Orthomyxoviridae*. En: Murphy, F.A., Gibbs, E.P., Horzinek, M.C., Studdert, M.J. (Eds.). *Veterinary Virology*, 3rd ed. Academic Press, London 1999; 459-468.
3. Horimoto, T., Kawaoka, Y. *Pandemic threat posed by avian influenza A viruses*. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 129-149.
4. World Health Organization. *Avian influenza frequently asked questions*. En: www.who.int/csr/disease/avian-influenza/avian-faqs/en/print/html
5. Reina, J. *Factores de virulencia y patogenicidad en las cepas gripales (virus influenza tipo A) aviarias y humanas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20: 346-353.
6. Karcher, F., Guglielmetti, P., Ciotti, M. *Avian influenza in Asia: Update from the Health Threats Unit at DG SANCO, European Commission*. *Eurosurveillance* 2004; 8: 1-5.
7. World Health Organization. *Avian influenza-fact sheet*. En: www.who.int/csr/don/2004-01-15/en/print.html
8. World Health Organization. *Avian influenza and the significance of its transmission to humans*. En: www.who.int/csr/don/2004_01_15/en
9. World Health Organization. *Avian influenza A (H5N1) virus infection in humans: Urgent need to eliminate the animal reservoir*. En: www.who.int/csr/don/2004_01_02/en
10. Moutou, F. *Role of aquatic birds migration in influenza transmission*. En: Dodet, B., Vicari, M. (Eds.). *Emergence and control of zoonotic ortho- and paramyxovirus diseases*. John Libbey Eurotext, Paris 2001; 17-24.
11. Reina, J. *La gripe aviaria. Una amenaza constante para el ser humano*. *Med Clin (Barc)* 2004; 122: 339-341.
12. Chen, H., Smith, G.J.D., Zhang, S.Y. y cols. *H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl*. *Nature* 2005; 436: 191-192.
13. World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. *Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia*. *Emerg Infect Dis J* 2005; 11: 1515-1521.
14. Tumpey, T.M., Basler, C.F., Aguilar, P.V. y cols. *Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus*. *Science* 2005; 310: 77-80.
15. Tabenberger, J.K., Reid, A.H., Lourens, R.M., Wang, R., Guozhong, J., Fanning, T.G. *Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes*. *Nature* 2005; 437: 889-893.
16. Monto, A.S. *The threat of an avian influenza pandemic*. *N Engl J Med* 2005; 352: 323-325.
17. Stöhr, K. *Avian influenza and pandemics. Research needs and opportunities*. *N Engl J Med* 2005; 352: 405-407.
18. Ungchusak, K., Auewarakul, P., Dowell, S.F. y cols. *Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1)*. *N Engl J Med* 2005; 352: 333-340.
19. Hayden, F., Croisier, A. *Transmission of avian influenza viruses to and between humans*. *J Infect Dis* 2005; 192: 1311-1314.
20. Osterholm, M.T. *Preparing for the next pandemic*. *N Engl J Med* 2005; 352: 1839-1842.
21. Guan, Y., Shortridge, K., Krauss, S., Webster, R.G. *Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: Were they the donors of the internal genes H5N1 viruses in Hong Kong?* *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9363-9367.
22. Guan, Y., Peiris, J.S., Lipatov, A.S. y cols. *Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8950-8955.
23. Shortridge, K., Zhou, N., Guan, Y. y cols. *Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong*. *Virology* 1998; 252: 331-342.
24. Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y., Webster, R.G. *The surface glycoprotein of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties*. *J Virol* 1999; 73: 1146-1155.
25. World Health Organization. *Avian influenza A (H5N1)*. *Weekly Epidemiol Rev* 2004; 79: 65-70.
26. Tran, T.H., Nguyen, T.L., Nguyen, T.D. y cols. *Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam*. *N Engl J Med* 2004; 350: 1179-1188.
27. Guan, Y., Poon, L.L., Cheung, C.Y. y cols. *H5N1 influenza A: A protean pandemic threat*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8156-8161.
28. Li, K., Xu, K.M., Peiris, J.S. y cols. *Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: A candidate for the next influenza pandemic in humans?* *J Virol* 2003; 77: 6988-6994.
29. Li, K.S., Guan, Y., Wang, J. y cols. *Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia*. *Nature* 2004; 430: 209-213.
30. Wright, P.F., Webster, R.G. *Orthomyxoviruses*. En: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.). *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2001; 1533-1579.
31. Lamb, R.A., Krug, R.M. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. En: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.). *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2001; 1487-1532.
32. Murphy, B.R., Hinshaw, V.S., Sly, D.L. y cols. *Virulence of avian influenza A viruses for squirrel monkeys*. *Infect Immun* 1982; 37: 1119-1126.
33. Beare, A.S., Webster, R.G. *Replication of avian influenza viruses in humans*. *Arch Virol* 1991; 119: 37-42.
34. Hunshaw, V.S., Webster, R.G., Turner, B. *The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in canadian waterfowl*. *Can J Microbiol* 1980; 26: 622-629.
35. Hinshaw, V.S., Webster, R.G., Naeve, C.W., Murphy, B.R. *Altered tissue tropism of human-avian reassortant influenza viruses*. *Virology* 1983; 128: 260-263.
36. Webster, R.G. *Predictions for future human influenza pandemics*. *J Infect Dis* 1997; 176: S14-S19.
37. Reina Prieto, J., Ballesteros Martínez, F. *La gripe en el siglo XXI: Preparándonos para una nueva pandemia*. *Rev Clin Esp* 2000; 200: 113-115.
38. Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., Kawaoka, Y. *Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses*. *Science* 2001; 293: 1840-1842.
39. Connor, R.J., Kawaoka, Y., Webster, R.G., Paulson, J.C. *Receptor specificity in human, avian and equine H2 and H3 influenza virus isolates*. *Virology* 1994; 205: 17-23.
40. Suzuki, Y. *Gangliosides as influenza virus receptors. Variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains*. *Prog Lipid Res* 1994; 33: 429-457.
41. Gambaryan, A.S., Tuzikov, A.B., Piskarev, V.E. y cols. *Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: Non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl (N-acetyl)lactosamine*. *Virology* 1997; 232: 345-350.
42. Matrosovich, M.N., Gambaryan, A.S., Teneberg, S. y cols. *Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyl-oligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site*. *Virology* 1997; 233: 224-234.
43. Rogers, G.N., Pritchett, T.J., Lane, J.L., Paulson, J.C. *Differential sensitivity of human, avian and equine influenza A viruses to a glyco-*

- protein inhibitor of infection: Selection of receptor specific variants.* Virology 1983; 131: 394-408.
44. Rogers, G.N., Paulson, J.C. *Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin.* Virology 1983; 127: 361-373.
 45. Couceiro, J.S., Paulson, J.C., Baum, L.G. *Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium: The role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity.* Virus Res 1993; 29: 155-165.
 46. Ito, T., Couceiro, J.S., Kelm, S. y cols. *Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential.* J Virol 1998; 72: 7367-7373.
 47. Rogers, G.N., Paulson, J.C., Daniels, R.S., Skehel, J.J., Wilson, I.A., Wiley, D.C. *Single amino acid substitutions in influenza hemagglutinin change receptor binding specificity.* Nature 1983; 304: 76-78.
 48. Naeve, C.W., Hinshaw, V.S., Webster, R.G. *Mutations in the hemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus.* J Virol 1984; 51: 567-569.
 49. Li, Z., Chen, H., Jiao, P. y cols. *Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model.* J Virol 2005; 79: 12058-12064.
 50. Subbarao, K., London, W., Murphy, B.R. *A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range.* J Virol 1993; 67: 1761-1764.
 51. Yao, Y., Mingay, L.J., McCauley, J.W., Barclay, W.S. *Sequences in influenza A virus PB2 protein that determine productive infection for an avian influenza virus in mouse and human cell lines.* J Virol 2001; 75: 5410-5415.
 52. Brown, E.G., Liu, H., Kit, L.C., Baird, S., Nesrallah, M. *Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: Identification of functional themes.* Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 6883-6888.
 53. Scholtissek, C., Stech, J., Krauss, S., Webster, R.G. *Cooperation between the hemagglutinin of avian viruses and the matrix protein of human influenza A viruses.* J Virol 2002; 76: 1781-1786.
 54. Widjaja, L., Krauss, S.L., Webby, R.J., Xie, T., Webster, R.G. *Matrix gene of influenza A viruses isolated from wild aquatic birds: Ecology and emergence of influenza A viruses.* J Virol 2004; 78: 8771-8779.
 55. Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., Klenk, H.D. *Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium.* Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 4620-4624.
 56. Fouchier, R.A., Schneeberger, P.M., Rozendaal, F.W. y cols. *Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome.* Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 1356-1361.
 57. Olofsson, S., Kumlín, U., Dimock, K., Arnberg, N. *Avian influenza and sialic acid receptors: More than meets the eye?* Lancet Infect Dis 2005; 5: 184-188.
 58. Uiprasertkul, M., Puthavathana, P., Sangsiriwut, K. y cols. *Influenza A H5N1 replication sites in humans.* Emerg Infect Dis J 2005; 11: 1036-1041.
 59. The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation of Human Influenza A/H5. *Avian influenza A (H5N1) infection in humans.* N Engl J Med 2005; 353: 1374-1385.
 60. Claas, E.C., Osterhaus, A.D., Van Beek, R. y cols. *Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus.* Lancet 1998; 351: 472-477.
 61. Iwatsuki-Horimoto, K., Kanazawa, R., Sugii, S., Kawaoka, Y., Horimoto, T. *The index influenza A virus subtype H5N1 isolated from a human in 1997 differs in its receptor-binding properties from a virulent avian influenza virus.* J Gen Virol 2004; 85: 1001-1005.
 62. Seo, S.H., Hoffmann, E., Webster, R.G. *Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses.* Nat Med 2002; 8: 950-954.
 63. Cheung, C.Y., Poon, L.L., Lau, A.S. y cols. *Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: A mechanism for the unusual severity of human disease?* Lancet 2002; 360: 1831-1837.
 64. Chen, H., Deng, Z., Li, G. y cols. *The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China.* Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 10452-10457.
 65. Gorman, O.T., Donis, R.O., Kawaoka, Y., Webster, R.G. *Evolution of influenza A virus PB2 genes: Implications for evolution of the ribonucleoprotein complex and origin of human influenza A virus.* J Virol 1990; 64: 4893-4902.
 66. Schultz, U., Fitch, W.M., Ludwig, S., Mandler, J., Scholtissek, C. *Evolution of pig influenza viruses.* Virology 1991; 183: 61-73.
 67. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Recommendations of the prevention, control and eradication of highly pathogenic avian influenza (HPAI) in Asia.* En: www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health/diseases/avian_fao.html 2005.