

Virus respiratorios: La gripe. Propiedades biológicas, ecología, vacunas y perspectivas ante una pandemia.

Raúl Ortiz de Lejarazu.

INTRODUCCION

La Gripe y los virus gripales están en contra de todos los dogmas. Hace casi 70 años se aisló el primer virus gripal y desde entonces se han producido cambios conceptuales importantes en todas las áreas de su conocimiento. De ser considerada una enfermedad exclusivamente humana se ha pasado a valorar la importancia de la gripe animal y su influencia en la posible génesis de pandemias. La importancia clínica concedida a la gripe ha cambiado según fuera su proximidad a epidemias importantes. A los nuevos conceptos para elaboración y desarrollo de vacunas antigripales les ha seguido la producción y comercialización de los nuevos antivirales que actúan sobre nuevas dianas del virus. Finalmente, el brote de gripe aviar H5N1 ocurrido en Hong Kong en 1997, con 18 casos en humanos, seis de ellos mortales y la demostración posterior de episodios nuevos por virus gripal A H9N2 alertaron a las administraciones sanitarias sobre la preocupación expresada por los expertos en gripe respecto a la aparición de una nueva pandemia de gripe.

La familia *Orthomyxoviridae* está constituida por un amplio grupo de virus RNA que se aislaron a partir de secreciones de las vías respiratorias en casos clínicos de gripe y otros síndromes respiratorios. El nombre de gripe como se conoce esta enfermedad en los países de habla española, deriva del acuñado por autores franceses en el siglo XVII y hace referencia al componente catarral en la acepción que se daba antiguamente a las afecciones respiratorias agudas. La denominación de *influenza* debe utilizarse exclusivamente para denominar el género taxonómico en el que están incluidos los virus gripales. Este apelativo, de origen florentino utilizado en el siglo XV, fue adoptada más tarde por los autores ingleses en el siglo XVII y hacía referencia a las creencias que se tenían sobre la “influenza” de la meteorología, el frío e incluso las estrellas y los planetas en la génesis de esta enfermedad, por ello los anglosajones utilizan el término “influenza” para denominar la enfermedad gripal y los virus que la causan.

La gripe es el nombre dado a la enfermedad respiratoria aguda causada por los virus

gripales A y B, esta enfermedad altamente contagiosa se caracteriza por sus apariciones en forma de epidemias anuales y con una periodicidad irregular y mucho más amplia en forma de pandemias. La infección gripal cursa con un amplio abanico de presentaciones clínicas que incluye desde formas autolimitadas hasta cuadros respiratorios de vías altas y bajas con repercusión sistémica y a veces complicaciones en órganos vitales.

Las epidemias de gripe ocurren cada año y suelen estar producidas por variantes menores de los tipos A y B de forma que dentro de los primeros años de vida casi nadie escapa a estas infecciones que dejan inmunidad protectora exclusivamente frente a la cepa de virus infectante, siendo la norma que los individuos sufran varios episodios gripales a lo largo de su vida. Podría indicarse como regla general que la gripe es una infección vírica estacional de una gran morbilidad en niños y personas jóvenes y de mayor mortalidad en ancianos y pacientes con patologías crónicas.

En los últimos años la gripe y los virus gripales han vuelto a ser objeto de renovada atención debido a su impredecibilidad y a la necesidad de adoptar un plan de medidas ante la posibilidad de aparición de una variable pandémica de virus gripal.

La gripe es una enfermedad de gran trascendencia en Salud Pública, marcada decisivamente por la variabilidad antigénica del virus causal. Su importancia deriva de su elevada capacidad de difusión, su alta morbilidad, su repercusión sobre la mortalidad y sus consecuencias económicas tanto en costes directos sobre el sistema sanitario como indirectos sobre el sistema productivo por el incremento del absentismo laboral. Estas características son especialmente acusadas en el caso de la gripe A que, además, puede presentarse en forma pandémica.

CONCEPTO Y TAXONOMÍA

El descubrimiento en 1933 por Smith, Andrewes, y Laidlaw del virus gripal A en humanos, mediante inoculación en hurones dio el nombre taxonómico original a la familia que durante años se denominó *myxoviridae* por agrupar a virus con afinidad por los receptores de células epiteliales de las mucosas. El nombre de myxovirus (*myxos*: moco) deriva de su afinidad por la mucina, mucoproteína presente en las secreciones respiratorias, en el suero sanguíneo y en receptores existentes en la membrana de los hematíes y algunos tejidos epiteliales. Cuando más adelante se descubrieron los virus parainfluenza aislados a

partir de muestras de procesos respiratorios que en ocasiones podían confundirse con algunas formas de gripe, el Comité Internacional Taxonómico de Virología (ICTV) decidió agrupar los virus gripales en la familia *Orthomyxoviridae* (ortho=verdadero) y a los virus parainfluenza en otra familia denominada *Paramyxoviridae*. Posteriormente la familia *Orthomyxoviridae* ha dado cabida a distintos géneros entre los que se incluyen los virus gripales A del hombre y de los animales, los virus gripales B casi exclusivamente humanos y los virus gripales C de menor importancia sanitaria descubiertos en 1951 por Taylor, estudiando la etiología de las enfermedades respiratorias mediante el cultivo en embrión de pollo y la hemagutinación para detectar el crecimiento vírico. Curiosamente el virus C, especie descubierta en último lugar, no crece especialmente bien en huevos embrionados, y su actividad hemaglutinante no es fácil de detectar ya que debe realizarse a temperatura de frigorífico.

El séptimo informe del Comité Internacional de Taxonomía Vírica (ICTV) ubica dentro del orden Mononegavirales a la familia *Orthomyxoviridae* en la que se agrupan los orthomyxovirus humanos y animales.

Los miembros de esta familia son virus con ARN monocatenario de polaridad negativa, segmentado, forma esférica o filamentosa con gran pleomorfismo, tamaño medio entre 50 a 120nm de diámetro, existiendo viriones con 20 nm de diámetro y 200-300 nm de longitud. Poseen simetría helicoidal y se hayan cubiertos con una membrana de envoltura de naturaleza fosfolipídica derivada de la célula huésped en la que se anclan espículas de naturaleza glicoproteica dotadas de propiedades hemaglutinantes y actividad enzimática. Sus huéspedes conocidos son el hombre y animales vertebrados. Desde el punto de vista taxonómico la familia *Orthomyxoviridae* incluye cuatro géneros: Influenza A, Influenza B, Influenza C y Thogotovirus (**tabla 1**)

Los géneros Influenzavirus A e Influenzavirus B constituyen los más importantes en virología clínica humana. Un tercer género Influenza C incluye los virus gripales C, con características estructurales y biológicas algo diferentes y de importancia mucho menor en patología humana que los anteriores. Finalmente un cuarto género denominado Thogotovirus ha sido propuesto y aceptado para incluir en él, otros virus que tienen 6 o 7 segmentos de ARN y el resto de características taxonómicas similares a los orthomyxovirus

están transmitidos por ácaros e infectan ocasionalmente al hombre (v. Thogoto y v. Dhori).

En virtud de sus antígenos superficiales dentro de los virus gripales A se reconocen distintos subtipos antigénicos. Debido al proceso de deriva antigénica característico de estos virus dentro de cada subtipo antigénico de gripe A existen cepas variantes menores. En los virus B solo existen variantes menores pero no subtipos antigénicos.

Filogenéticamente se ha especulado que los virus gripales que primero franquearon la barrera de especie desde su reservorio animal al hombre fueron los C y los B, mientras que los del tipo A serían los últimos en haber accedido a la población humana. Este hecho puede ayudar a explicar en parte la mayor estabilidad evolutiva genética y antigénica del virus gripal B respecto al A y las notables diferencias biológicas y patológicas del virus C respecto a los otros virus gripales. Los virus gripales A son probablemente los últimos en infectar a la especie humana y continúan su proceso de evolución, una de cuyas características es la deriva antigénica y otra la capacidad de producir epidemias o pandemias de notable intensidad. Los virus gripales B efectuaron posiblemente ese proceso hace más tiempo y aunque experimentan también deriva antigénica, ésta es menor y hasta el momento presente no han sido capaces de difundir en forma pandémica. Del virus C se conocen distintas variantes y recombinantes aunque ninguna de ellas se impone genéticamente a las otras y como ha sido comentado, su importancia en patología clínica respiratoria es mucho menor.

Los virus gripales A y B causan en el hombre una infección aguda del aparato respiratorio con fuerte repercusión sistémica que se denomina gripe. El reservorio natural de los virus gripales A son los ánades salvajes migratorios que actúan como un auténtico banco genético en los que se han identificado todos los tipos antigénicos de hemaglutinina y neuraminidasa conocidos; sin embargo, solo unos pocos subtipos antigénicos infectan al hombre. Los virus gripales A tienen la capacidad de cruzar la barrera de especie, infectando en condiciones naturales a mamíferos marinos y semiacuáticos así como a diversos mamíferos y aves domésticas (gripe porcina, gripe equina, peste aviar de pollos, pavos y patos). Los virus gripales B y C están mucho más circunscritos a la especie humana aunque existen descripciones de aislamientos y circulación restringida en algunas especies animales. Esta diferencia entre los virus A y B tiene implicaciones importantes en la

epidemiología.

Como la mayoría de los virus cubiertos, la membrana lipídica condiciona que los virus gripales A y B humanos sean muy sensibles al éter y a los agentes externos. Su escasa resistencia en el medio ambiente y su vía de eliminación por secreciones respiratorias explican su transmisión habitual por mecanismo aéreo directo, en este capítulo se hará especial incidencia en los virus gripales A y B que infectan al hombre.

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

Genoma

La información genética de los virus gripales reside en un ARN monocatenario, de polaridad negativa y segmentado que contiene entre 12000 a 15000 nucleótidos. La mayoría de los segmentos codifican una única proteína aunque hay excepciones. Los virus gripales A y B poseen ocho segmentos mientras que los virus C solo tienen siete. Cada uno de los segmentos codifica proteínas estructurales y no estructurales cuya denominación, peso molecular y función se indica en la **tabla 2**. En los virus gripales A y B los ocho segmentos codifican diez proteínas virales; ocho de ellas forman parte de la estructura del virus y se denominan proteínas estructurales, mientras que las otras dos aparecen exclusivamente en la célula infectada por lo que se denominan proteínas no estructurales (NS). Recientemente se ha descrito que la proteína NS2 se haya en pequeña cantidad formando parte de la partícula viral por lo que hay nueve proteínas estructurales en los virus A y B. El tamaño del genoma es mayor para los virus B que para los A. En algunos virus B se ha evaluado en 14639 nucleótidos mientras que para la cepa A/PR/8/34 es de 13588 nucleótidos. Esta diferencia de alrededor de 1000 nucleótidos no se debe a un mayor número o tamaño para las proteínas que codifica sino a que el ARN de los virus B tiene secuencias no codificantes más largas.

En todos los virus gripales los tres segmentos genómicos de mayor tamaño (1 a 3) codifican la síntesis de tres polipéptidos de elevado peso molecular (90-85 kDa) que constituyen el complejo ARN polimerasa formado por las proteínas PB2, PB1 y PA, asociado al nucleocápside.

En los virus A los segmentos genómicos 4, 5, 6 y 7 codifican las proteínas y glicoproteínas más importantes desde el punto de vista estructural y antigénico; el segmento

4 codifica la hemaglutinina (HA) y el segmento 6 la neuraminidasa (NA) que son las glicoproteínas ancladas en la membrana de envoltura del virus. El segmento 5 codifica la síntesis de la nucleoproteína (NP), mientras que el segmento 7 codifica dos proteínas: la proteína matriz (M1) o proteína M y la proteína M2 que funciona como un canal iónico en la membrana de envoltura del virus. El segmento 8 codifica la síntesis de dos proteínas NS1 y NS2 que se encuentran en la célula infectada pero no en el virión aislado, aunque como ya se ha expuesto existen indicios de NS2 en los viriones además de en las células infectadas. Como se observa en la **tabla 2** alguno de los segmentos genómicos codifican más de una proteína y existen diferencias genómicas importantes entre los virus A, B y C.

Los géneros Influenzavirus B y C difieren del A en lo referente a su genoma (7 segmentos en el virus C) y las estrategias de traducción así como en los productos proteicos codificados por los últimos segmentos. La proteína M1 o matriz está codificada en los virus A y B por la transcripción completa del fragmento 7, mientras que en los virus C es el resultado de un *splicing* en el segmento 6. La proteína M2 (canal iónico) del virus A codificada por un segundo marco de lectura del segmento 7 tiene su equivalente funcional en la proteína NB del virus B codificada en este virus por una región más corta del segmento genómico 6 que codifica también la NA. En los virus C la proteína equivalente sería la CM2 codificada por el segmento 6, ya que este género solo posee 7 segmentos de ARN. Como puede observarse el segmento 7 de los virus B codifica una proteína más pequeña (BM2) que no aparece en los virus A ni C, cuya función se desconoce. Finalmente las proteínas NS1 y NS2 están codificadas por el segmento 8 en los virus A y B y por el 7 en los virus C.

Debido a las diferencias en el número de segmentos y a las equivalencias funcionales distintas de sus productos; las siglas de denominación bioquímica no se corresponden con la funcionalidad de la proteína. Resumiendo, en los virus gripales A los 8 segmentos genómicos codifican diez polipéptidos (estructurales y no estructurales) mientras que en los virus B codifican once polipéptidos. Los virus C con 7 segmentos codifican nueve polipéptidos.

El genoma de los virus gripales, y muy especialmente el del virus gripal A, presenta dos características que explican su extraordinaria variabilidad antigénica.

Por una parte, la segmentación del genoma explica la posibilidad de que en casos de infecciones por dos virus A distintos se produzcan fenómenos de recombinación genética ("genetic reassortment") con intercambio de segmentos entre los dos virus parentales. La progenie de esas recombinantes está constituida por virus distintos que poseen y expresan mezclas de genes de los virus originales. Por otra parte, todos los segmentos de ARN muestran, como ocurre en otros virus ARN, y muy acusadamente en éstos, una elevada capacidad de mutación debida a la falta de corrección de errores de la ARN polimerasa. Así la mutación ocurrida en un segmento se traduce en variaciones en los epítomos de sus productos génicos. Esta variabilidad tiene repercusiones patogénicas diferentes y distinta frecuencia dependiendo del segmento genómico del virus en el que ocurra la mutación, siendo particularmente importantes y frecuentes las del segmento 4 que codifica la hemaglutinina. El virus gripal responde al concepto de cuasiespecie acuñado para designar a los virus ARN de extrema variabilidad.

Morfología, estructura y funciones biológicas

Las principales características de los virus gripales se recogen en la Tabla 3. Los viriones tienen forma esférica o filamentosa y presentan con frecuencia un gran pleomorfismo debido al sistema de cultivo o a los métodos de preparación usados en microscopía electrónica. Los virus gripales A y B tienen la misma morfología y apariencia externa. En los virus C la superficie tiene un aspecto reticular hexagonal particular y distinto del resto de virus gripales.

En la **figura 1** se ilustra la organización de los diferentes elementos estructurales del virus gripal; el core viral está formado por la ribonucleoproteína (RNP) del virus que puede ser estudiada mediante solubilización del virus por detergentes (SDS, Nonidet p40, Triton X100, etc.) que actúan disolviendo la membrana de envoltura y la proteína M según la concentración a la que se empleen.

La RNP está compuesta por el ARN que en el caso del virus gripal A y el B está segmentado en 8 fragmentos, cada uno de esos segmentos está encapsidado de forma independiente por la nucleoproteína (NP), una proteína de 60 kDa que forma un tubo flexible enrollado en espiral sobre sí mismo y asociado a su vez a un complejo ARN polimerasa constituido por las proteínas denominadas PB1, PB2 y PA de elevado peso

molecular (80-95 kDa) **figura 2**. Las proteínas PB1 y PB2 se hayan implicadas en la iniciación y elongación durante la transcripción del ARNm mientras que la proteína PA es responsable de la replicación del ARN viral. En cada segmento de RNP existe un complejo de ARN polimerasa que interviene en la transcripción del ARN y en la síntesis del ARN complementario y vírico; aunque en este proceso participan también la NP y alguna de las pequeñas proteínas no estructurales. Los segmentos de RNP así formados pueden tener los extremos formando bucles debidos al plegamiento helicoidal sobre sí mismos.

Situada por debajo de la membrana de envoltura se haya una cubierta proteica muy abundante compuesta por la proteína matriz o proteína M1 de un peso molecular de unos 17 kDa. Esta proteína está implicada en el control de la actividad de la ARN polimerasa viral y confiere estabilidad al virión interaccionando con la ribonucleoproteína, la cubierta lipídica y con las espículas de la cubierta.

Por fuera de la proteína matriz se dispone la membrana de envoltura, de naturaleza fosfolipídica, que deriva de la membrana citoplasmática de la célula huésped. En los virus gripales A dicha membrana incluye la proteína M2 que funciona como un canal iónico facilitando la acidificación del interior del virión durante su paso por el endosoma celular en las etapas precoces de la infección. Este cambio de pH es necesario para la decapsidación del virus y la liberación del ácido nucleico viral y es bloqueada por la amantadina y la rimantadina. El hecho de que esta proteína sea diferente en los virus B (NB) aunque tiene la misma función que en los A, explica la causa por la cual la amantadina y rimantadina son ineficaces frente a los virus gripales B. (**tabla 4**)

En la membrana de envoltura de los virus gripales se anclan glicoproteínas en forma de proyecciones o espículas superficiales de 10 a 14 nm de longitud y 4 a 6 de diámetro que son muy aparentes en las preparaciones de microscopía electrónica. En los virus gripales A y B son de dos tipos: hemaglutinina y neuraminidasa mientras que en el virus C solo son de un tipo con propiedades enzimáticas y hemaglutinantes en la misma molécula. (**tabla 4**)

La hemaglutinina (HA) es el componente glicoprotéico más importante y constituye alrededor del 40% de las proteínas del virus. En cada virión existen aproximadamente 350-400 de estas proyecciones. La molécula forma una de las espículas superficiales y tiene un peso molecular aproximado de 250 kDa. Tiene una estructura de trímero formado por tres

subunidades idénticas de 80 kDa ancladas en la membrana fosfolipídica del virión. La molécula precursora HA₀ de 550 aminoácidos necesita ser escindida en dos subunidades (HA₁ de mayor tamaño y HA₂) que quedan unidas por puentes disulfuro; esta escisión proteolítica realizada por enzimas del huésped es necesaria para la fusión de membranas viral y celular y la entrada del virus en las células diana y por consiguiente para la infectividad del virus (**figura 3**).

En la HA se reconocen distintas regiones o dominios con funciones específicas que han podido ser definidos mediante estudio cristalográfico con rayos X. Existe una región globular de la cabeza compuesta por aminoácidos de la subunidad HA₁ y otro dominio alargado o tallo próximo a la membrana de envoltura del virus compuesto por aminoácidos de la subunidad HA₂ y algunos de HA₁. En el dominio globular de la cabeza se han identificado cinco regiones antigénicas solapadas además del sitio específico para el receptor de unión (*pocket*). La región alargada del tallo consiste en tres hélices enrolladas entre sí que estabilizan la molécula.

La HA cumple una serie de funciones biológicas fundamentales en las etapas iniciales de la infección vírica. Actúa como receptor de unión siendo responsable de la adsorción a la célula diana mediante la fijación de su extremidad libre hidrófila y N-terminal a los receptores mucoprotéicos (que contienen residuos de ácido N-acetilneuramínico o siálico) de las células del epitelio respiratorio y otras células diana, primer paso necesario para la penetración y replicación del virus. También se fija a los receptores del mismo tipo presentes en los hematíes, circunstancia responsable del fenómeno de la hemaglutinación, importante característica biológica de los virus gripales. La hemaglutinación permite la cuantificación de la actividad biológica de una suspensión vírica mediante el uso de hematíes de diversas especies animales y diluciones crecientes del virus.

La HA aparece también en la membrana citoplásmica de las células infectadas por el virus gripal provocando el fenómeno de la hemadsorción, útil para la detección del virus en cultivos celulares. Debido a que las proyecciones de HA participan en la adhesión, fusión entre la membrana celular y la envoltura vírica y, en consecuencia, en la penetración vírica; la HA es la molécula responsable principal de la infectividad del virus gripal y los

anticuerpos generados contra ella son de carácter neutralizante.

La neuraminidasa (NA) es el otro tipo de proyección glicoprotéica que presenta la superficie del virus gripal. Representa alrededor de un 5% de las proteínas totales del virión, que contiene aproximadamente una espícula de NA por cada siete u ocho espículas de HA; cada virión muestra alrededor de 50 espículas de NA agrupadas en parches distribuidos por la superficie del virus. La molécula de NA, que tiene forma de champiñón, se presenta como un tetrámero de unos 240 kDa, compuesto por cuatro subunidades idénticas unidas formando una cabeza globular y un tallo largo filamentoso (**figura 4**).

Funcionalmente, la NA del virus gripal es un enzima N-acetil-neuraminilhidrolasa (sialidasa), y su actividad biológica provoca la ruptura de las uniones glicosídicas adyacentes al ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico) presente en casi todas las cadenas de oligosacáridos de proteínas glicosiladas (mucinas) y también en los receptores celulares para la HA. Por esta actuación enzimática la NA del virus gripal destruye el receptor de unión a la célula. Este hecho fue descrito por primera vez por Hirst al observar que los hematíes aglutinados por los virus gripales se eluían más tarde y no podían ser aglutinados de nuevo por otros virus gripales debido a que la actuación de la NA destruía el receptor siálico (celular) de unión a la hemaglutinina vírica.

Las funciones biológicas de la NA parecen muy importantes en el ciclo replicativo del virus gripal. Palese y Compans en 1976 demostraron que el cultivo de virus gripal en presencia de inhibidores enzimáticos daba como resultado un único ciclo replicativo viral ya que la progenie vírica generada quedaba inmovilizada en la superficie de la célula infectada.. La NA no juega ningún papel en la fusión y penetración, pero interviene de forma decisiva en las etapas últimas del ciclo y específicamente en la liberación del virus desde la célula infectada y por consiguiente en su difusión de célula a célula. La NA puede tener además cierta acción estabilizadora del virus frente a la acción hidrolizante del moco en las vías respiratorias, permitiendo al virus atravesar la capa de moco y acceder a las células del epitelio respiratorio.

La proteína M2 es el tercer elemento estructural anclado en la membrana de envoltura de los virus gripales. Esta proteína forma un tetrámero que actúa como un canal iónico permitiendo la acidificación del interior del virus en las primeras etapas de la

penetración viral durante su paso a través del endosoma, circunstancia necesaria para la liberación de los segmentos del nucleocápside vírico (ribonucleoproteína) en el citoplasma celular (**figura 5**). En los virus B (género Influenzavirus B) es distinta, se denomina proteína NB y está codificada por el segmento 6 del ARN viral (en un marco de lectura superpuesto en el mismo ARNm que codifica la NA). En los virus C el equivalente funcional de dicha proteína podría corresponderse con la denominada CM2 codificada por el segmento genómico 6 de dichos virus.

El virus gripal C difiere de los virus gripales A y B en muchos aspectos estructurales y genéticos. Entre los más importantes desde el punto de vista taxonómico cabe destacar la presencia de siete segmentos de ARN. Posee una única glicoproteína de superficie con actividad hemaglutinante y enzimática, denominada HEF (hemaglutinina-esterasa-fusión) con un peso molecular de 72 kDa y alrededor de 100 aminoácidos más que la HA de los virus A y B. Al igual que sucede con la HA para ser activa precisa escindirse a partir de su proteína precursora en dos subunidades HEF₁ de 48 kDa y HEF₂ de 22,5 kDa. La HEF posee una doble actividad biológica hemaglutinante y enzimática. La actividad enzimática se traduce en la capacidad de romper el receptor de ácido siálico para la hemaglutinina mediante una actividad esterasa en lugar de la actividad neuraminidasa característica de los virus gripales A y B.

Desde el punto de vista filogenético, la antigüedad de los linajes de los virus gripales que circulan actualmente en el hombre son distintos. La mayor estabilidad evolutiva genética y antigénica de los virus B y C respecto de los A y las notables diferencias biológicas y patológicas serían la consecuencia de un mayor grado de adaptación al hombre.

REPLICACIÓN

El virus se fija mediante el dominio de adhesión específico de la hemaglutinina (HA o HEF) a los receptores glicoproteicos con a. siálico de las células diana. La penetración tiene lugar por internalización de la partícula vírica mediante la formación de una vacuola de endocitosis; proceso denominado genéricamente *viropexis* llevado a cabo por las dos fracciones de la HA. Tras la formación de dicho endosoma comienza la etapa de decapsidación del virus en la que participa la HA en la fusión de membranas, víricas y

celular. El ambiente ácido (pH 5-6) del endosoma hace que se activen cambios conformacionales en la estructura de la HA que dan como lugar una fusión de las membranas vírica y celular del endosoma, liberándose el core viral. Al mismo tiempo la proteína M2, que actúa como un canal iónico (**figura 5**), permite que se acidifique el interior de la partícula vírica durante su paso por el retículo ergastoplásmico celular produciéndose una disociación ácida de la ribonucleoproteína y la proteína matriz necesaria para la decapsidación del virus y la liberación del ARN y la ARN polimerasa y su posterior migración desde el citoplasma de la célula al núcleo.

La transcripción primaria del ARN viral en un ARN complementario se lleva a cabo por el complejo ARN polimerasa (PB1, PB2, y PA), este paso tiene lugar utilizando iniciadores celulares de ARN, por esto los virus gripales no bloquean completamente la síntesis de ADN celular ya que la necesitan para producir de forma continua los fragmentos iniciadores que se consumen en esta transcripción precoz. El ARN complementario sintetizado sirve para la elaboración del ARN viral y cada segmento genómico se transcribe en ARNm que codifica uno o dos polipéptidos virales mediante *splicing*, este proceso ocurre en el núcleo celular, donde tiene lugar la producción de la nueva RNP vírica. Los diversos componentes migran al citoplasma celular y la HA y la NA se sitúan en la membrana citoplasmática. El proceso de maduración y ensamblaje de los nuevos virus se realiza con la contribución de la proteína M que se sitúa por debajo de la membrana citoplásmica de la célula infectada agrupando los segmentos de RNP formados.

La liberación de las nuevas partículas víricas ensambladas en el citoplasma tiene lugar por gemación a través de la membrana de la célula huésped. Así se incorporan la envoltura lipídica y las espículas de glicoproteínas HA y NA formadas y presentes en la superficie de la célula infectada. En el proceso de liberación de los nuevos virus tiene una importancia crucial la acción enzimática de la NA gripal que al destruir los receptores de ácido siálico permite que los viriones formados infecten otras células. Los virus gripales son citocidas ya que la liberación de las nuevas partículas víricas formadas supone la muerte celular.

CULTIVO

Los virus gripales se cultivan con facilidad sobre células primarias de riñón de

mono. Debido a la dificultad en disponer de éstas células ha sido necesario buscar un sistema celular alternativo. La línea celular de riñón de perro MDCK (Madin-Darby canine kidney) permite con facilidad la multiplicación de los virus gripales A y B y ha sustituido al riñón de mono utilizado clásicamente. Como las líneas celulares no poseen proteasas que puedan realizar la escisión proteolítica postraslacioneal de la HA₀, el crecimiento viral se potencia si se añade tripsina tratada con 1-tosylamida-2-feniletíl clorometilcetona (tripsina-TPCK), lo que hace posible la existencia de sucesivos ciclos de replicación vírica. También se ha conseguido el cultivo y aislamiento de virus gripal A y B en células MRC5 (fibroblastos embrionarios humanos diploides de pulmón) y en células Vero. Para los virus gripales C existe una línea de melanoma humano muy susceptible a la infección.

La temperatura para el crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares empleadas es de 37°C, pero el cultivo de los virus se hace a 33-34°C previa adsorción durante 2 horas en posición estacionaria. Para facilitar el crecimiento vírico, el medio que se añade tras la adsorción debe contener tripsina-TPCK al uno/dos por mil (1-2 µg/ml).

El efecto citopático de los virus gripales puede variar considerablemente. Aunque algunas cepas pueden destruir el tapiz celular en pocos días tras la inoculación, en general el efecto citopático es pequeño y raramente puede observarse una acción citopática característica. El virus gripal A produce un efecto citopático lento con redondeamiento y degeneración paulatina de las células. La detección del crecimiento vírico en el sobrenadante se realiza por hemaglutinación y en las células infectadas por hemadsorción. En esta última técnica se añade una suspensión de hematíes al cultivo celular y tras incubación, se observa la adhesión de los hematíes a las células en las que crece el virus. El virus gripal B tiene un efecto citopático más evidente y produce inclusiones basófilas citoplásmicas perinucleares.

Los virus gripales A y B pueden aislarse también sobre huevos embrionados de gallina de 10 a 11 días, mientras que para los virus C resultan más adecuados los huevos de 7-8 días. Los embriones deben inocularse por vía amniótica y alantoidea e incubarse durante 72 horas a 33-34°C para los virus A y B y hasta cinco días para los virus C. El crecimiento vírico en los líquidos alantoideo o amniótico se detecta por hemaglutinación. Se añade una suspensión de hematíes al líquido correspondiente extraído, observándose tras

incubación, la sedimentación de los hematíes en forma de tapiz en los líquidos con virus gripal.

La sensibilidad de los cultivos celulares para el aislamiento de los virus gripales humanos circulantes en los últimos años es muy superior a la sensibilidad del embrión de pollo, debido probablemente a cambios ocurridos en el receptor de unión de la hemaglutinina en los virus que circulan actualmente. No obstante, el cultivo en embrión de pollo permite la rápida obtención de grandes cantidades de virus y es el sistema de crecimiento utilizado para la preparación de vacunas. En relación con su incorporación a la vacuna, es necesario tener en cuenta que los virus gripales humanos crecidos en huevo embrionado pueden tener la antigenicidad de su HA alterada (fenotipo adaptado al huevo).

El animal de elección para la inoculación experimental es el hurón que por instilación nasal reproduce un proceso similar al que ocurre en el hombre. Los sueros hiperinmunes para el estudio antigénico se producen en el hurón, o alternativamente en gallinas, ratones e incluso ovejas tras inyección parenteral.

ESTRUCTURA ANTÍGENICA

La mayor parte de las proteínas estructurales de los virus gripales son reconocidas como extrañas por el sistema inmune maduro y son capaces de estimular la producción de anticuerpos. Básicamente los virus gripales A y B tienen cinco proteínas internas no glicosiladas (NP, M, PB1, PB2 y PA) y tres proteínas integradas en la membrana de envoltura (HA, NA y M2 o NB), dos de ellas glicosiladas. Por ello, los antígenos en los virus gripales se denominan internos y superficiales y tienen implicaciones distintas tanto desde el aspecto inmunitario protector como para la patogenia del virus.

Antígenos de los virus gripales

Los **antígenos internos** principales son la nucleoproteína (NP) y la proteína M1 denominados también antígenos solubles debido a que se ponen mejor de manifiesto en las partículas víricas fragmentadas. Ambos antígenos son específicos de género, la ribonucleoproteína del nucleocápside es distinta en los virus gripales A, B y C, sin reacciones cruzadas entre ellas. En el suero de los enfermos aparecen anticuerpos fácilmente demostrables por fijación del complemento, técnica útil en el diagnóstico, aunque no permite diagnosticar el tipo o la variante concreta causal de virus gripal. Los

anticuerpos frente a la NP no tienen carácter neutralizante y su papel en la inmunidad a la infección es limitado.

La proteína M1 es el antígeno profundo más abundante. Al igual que la NP es específica de género y la respuesta inmunitaria frente a ella parece estar implicada en la inmunidad celular frente a la reinfección.

Los antígenos superficiales más importantes son la hemaglutinina y la neuraminidasa denominados internacionalmente H y N respectivamente cuando se refieren a la composición o matrícula antigénica de un virus. La hemaglutinina es el antígeno más importante desde el punto de vista de la inmunidad protectora y la patogenia del virus. En el suero de los enfermos y vacunados aparecen anticuerpos frente a ella a partir de la primera semana que al unirse a dominios próximos de los responsables de la adsorción a receptores celulares impiden la fijación del virus a las células diana, neutralizando la infectividad vírica. Estos anticuerpos de carácter neutralizante se detectan por reacción de inhibición de la hemaglutinación (RIH)

La hemaglutinina es un antígeno que da lugar a dos especificidades antigénicas. Es específica de subtipo, por inmunodifusión doble se ha descrito en los virus gripales A la existencia de 15 subtipos de HA que se denominan desde H1 a H15. Todas esas diferentes hemaglutininas se han identificado en virus gripales de origen aviar y algunas también en mamíferos. Hasta donde conocemos, de los quince subtipos de H conocidos, sólo tres (H1, H2 y H3) han formado parte de los virus responsables de la gripe humana. **Tabla 5**

La hemaglutinina define, además del subtipo, la especificidad antigénica de variante. En la estructura terciaria de la HA se ha comprobado la existencia de al menos cuatro epítomos mayores. La elevada capacidad de mutación que presenta el segmento 4 del ARN, que codifica la HA, se traduce en variaciones en dichos epítomo que suponen las variantes dentro del subtipo. Es decir, la HA además de ser subtipo específica (H1 a H15) es específica de cepa o variante dicha especificidad se identifica por el nombre propio de cada cepa o variante como se explica más adelante.

La neuraminidasa es el otro antígeno superficial. En la superficie de la molécula de la N, rodeando la zona de unión al ácido siálico, se han identificado al menos dos epítomos de reconocimiento y unión para anticuerpos. En el suero de los enfermos y vacunados

aparecen anticuerpos anti-NA, que se detectan mediante una reacción de inhibición de su acción enzimática poco utilizada por su complejidad. Estos anticuerpos *in vivo* limitan la difusión de los virus a partir de las células infectadas y la transmisión entre los animales susceptibles. Aunque solo son neutralizantes a concentraciones muy elevadas, restringen la replicación vírica y atenúan la enfermedad. Son por consiguiente también anticuerpos protectores, aunque en menor medida que los anti-HA.

La neuraminidasa es también un antígeno específico de subtipo. Mediante reacciones de inmunodifusión doble se han identificado nueve subtipos de N en el virus gripal A, que se denominan del N1 al N9, todos se han identificado en virus gripales de origen aviar y algunas también en mamíferos. De los nueve subtipos de N conocidos, sólo tres (N1, N2 y probablemente N8) han formado parte de los virus responsables de las epidemias de gripe humana conocidas. La deriva antigénica parece ser menor que la de la HA.

Nomenclatura

Los virus gripales se denominan taxonómicamente por un acrónimo en el que se incluye en primer lugar el tipo de virus gripal A, B o C. Si la cepa no es de origen humano se indica a continuación el huésped animal en el que se ha aislado. Después se nombra el origen geográfico, número de laboratorio de la cepa y año de aislamiento seguido entre paréntesis de la descripción antigénica del subtipo de HA y NA según la nomenclatura internacional expuesta anteriormente. De esta forma los virus gripales A se identifican en subtipos por sus antígenos superficiales (H y N), y cada subtipo incluye un número ilimitado de variantes menores definidas por las características propias de su HA.

La nomenclatura de los virus A aislados consignando las anteriores características queda como sigue en los siguientes ejemplos: A/Singapore/1/57 (H2N2), A/Hong Kong/8/68 (H3N2), A/Hong Kong/156/97 (H5N1), A/swine/Iowa/15/30 (H1N1) A/duck/Hong Kong/47/76 (H7N2). En los virus B al no existir subtipos de HA ni de NA dicha nomenclatura no se incluye la matrícula antigénica, por ejemplo: B/Beijing/184/93

Variaciones antigénicas

Los virus tratan de evadir la respuesta del huésped para asegurar su perpetuación durante años en las especies que son capaces de infectar. Una de las formas de evasión de la

respuesta inmune es la variación antigénica. Los virus gripales muestran un grado excepcional de variabilidad caracterizado por dos tipos de variaciones antigénicas denominadas variaciones menores y mayores. Este fenómeno es de especial relevancia en el género Influenzavirus A y de mucha menor trascendencia en el género Influenzavirus B o en el C.

Las variaciones menores o deriva antigénica ("antigenic drift"), afectan sobre todo a la HA y son el resultado de mutaciones puntuales espontáneas en los genes que codifican la HA y en menor grado la NA de un subtipo de virus gripal que se traducen en cambios antigénicos y biológicos de esas glicoproteínas. Las mutaciones también afectan a otros segmentos genómicos (NP, M1, M2), pero obviamente no se traducen en modificación de los antígenos superficiales. La frecuencia con que ocurren estas mutaciones espontáneamente en la naturaleza es difícil de precisar, pero las experiencias de laboratorio sugieren unas tasas de mutación muy altas, tanto para el gen de la HA como de la NA (1.10^5), y más bajas para el resto de genes. Cada mutación supone la sustitución de uno o pocos aminoácidos en la secuencia del producto genómico aunque muchas son deletéreas.

Sobre la base de mutaciones aleatorias que se producen en la HA o en la NA de las poblaciones virales, se seleccionan aquellas que permiten al virus escapar de la denominada inmunidad de grupo. Se ha podido comprobar la coexistencia de "distintos" virus gripales en una misma persona de acuerdo con el concepto de cuasiespecies formulado para definir cierta heterogeneidad de las cepas de gripe que infectan a un individuo.

Las variaciones menores 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 precursoras del mismo subtipo de HA. 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 la estructura principal de 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.

Aunque las mutaciones son espontáneas, y en consecuencia no están inducidas por los anticuerpos presentes en una persona parcialmente inmunizada, se admite que el paso del virus por una persona de estas características supone una importante presión de

selección que favorece la difusión de las nuevas variantes. Se estima que las cepas potencialmente epidémicas, resultado de variaciones menores, son aquéllas que han sufrido cambios sucesivos que afectan a los cuatro epítomos principales de la HA. La deriva antigénica continúa en tanto que un subtipo persiste circulando entre humanos. Las mutaciones sufridas por las actuales variantes menores del subtipo A (H3N2), aparecido en 1968, parecen estar circunscritas a un grupo de 18 codones del segmento genómico de la HA.

Las variaciones menores son la base de las cepas epidémicas de gripe que ocasionan los brotes epidémicos estacionales y otros brotes más limitados. Sin embargo no puede descartarse que provoquen epidemias importantes. Aunque la sustitución de pocos nucleótidos en la cadena de ARN al producirse la mutación, supone únicamente la inclusión de pocos aminoácidos equivocados en la secuencia de la H correspondiente, la estructura secundaria y terciaria de la glicoproteína puede resultar alterada de forma sustancial y sus propiedades antigénicas también. Esto es lo que sin duda ocurrió con la cepa de difusión pandémica de 1947 que, conservando el mismo subtipo H1, debió originarse por mutaciones sucesivas del virus responsable de la gripe de 1918.

Las variaciones menores ocurren tanto en el virus de la gripe A, como en el virus de la gripe B, aunque en este último suceden con menor frecuencia, este hecho parece ocurrir también con las cepas A (H1N1) desde su reaparición en 1977. La aparición de estas variantes menores tiende a hacer desaparecer de la circulación a las cepas antiguas por distintos factores, entre los cuales la disminución de población susceptible es importante y provoca la extinción de la difusión de la variante antigua en uno o dos años. Desde hace algún tiempo se siguen minuciosamente como consecuencia de la transcendencia epidemiológica de la gripe y la necesidad anual de diseño de vacunas inactivadas.

El concepto de variaciones mayores o sustituciones antigénicas ("*antigenic shift*") implica un cambio total del antígeno H, del antígeno N o de ambos. Las pandemias gripales ocurren generalmente como consecuencia de la aparición o emergencia de un nuevo subtipo del virus gripal A denominado variante mayor. Al aparecer un subtipo diferente al que circulaba hasta entonces entre la población, ésta carece totalmente de experiencia inmunológica y por consiguiente el nuevo subtipo puede difundir con extraordinaria

eficacia. Esta clase de variación no ocurre en los virus gripales B.

Los nuevos subtipos del virus gripal A aparecen por recombinación genética entre cepas diferentes. Este fenómeno se descubrió al analizar los genomas de los virus A (H2N2) y (H3N2). Las cepas parentales pueden proceder de cualquiera de los múltiples hospedadores, mamíferos o aves, susceptibles a estos virus.

Experimentalmente, la infección mixta tanto *in vitro* como *in vivo* proporciona con facilidad el aislamiento de cepas recombinantes antigénicamente híbridas, es decir, con la H de uno de los virus parentales y la N del otro. Como consecuencia de la recombinación de otros segmentos se pueden obtener recombinantes que manteniendo los antígenos superficiales de una de las cepas (H y N), posean algún otro segmento genómico que confiera propiedades de la otra cepa parental, por ejemplo la facilidad de multiplicación en embrión de pollo, crecimiento a bajas temperaturas, mayor virulencia, etc.

Los 8 segmentos genómicos de los virus gripales A pueden intercambiarse aleatoriamente cuando una célula sufre una infección doble. Por consiguiente hay 256 posibles combinaciones teóricas aunque no todas son viables en la práctica. Si atendemos únicamente a los segmentos 4 y 6, responsables del subtipo antigénico (H-N) de los virus gripales, la existencia de los 15 subtipos de H y los 9 de N nos da la posibilidad matemática de 135 subtipos o combinaciones teóricas para la matrícula antigénica de los virus gripales. En la práctica muchas de esas posibles combinaciones no han sido todavía encontradas en la naturaleza. Las razones no se conocen completamente; algunos segmentos genómicos pueden segregarse conjuntamente, y la capacidad de multiplicación de los recombinantes surgidos depende, entre otros factores, de la gran presión de selección en favor de alguna de las recombinantes producidas ejercida por la célula huésped.

La demostración de que la recombinación genética ocurre de forma espontánea en la naturaleza se ha conseguido en los últimos años comprobándose tanto en el hombre como en aves migratorias. La secuenciación del genoma de los virus de 1957 “gripe Asiática” (H2N2) permitió apreciar que los genes HA, NA y uno de las proteínas internas (PB1) eran de origen aviar mientras que los otros 5 genes derivaban de una cepa humana subtipo H1N1. Por su parte, el subtipo H3N2 (gripe Hong Kong) apareció por recombinación entre un subtipo humano H2N2 y un subtipo aviar ya que tiene seis segmentos comunes con la

cepa H2N2 precedente pero el segmento cuatro que codifica la HA y uno de las proteínas internas (PB1) son de origen aviar ya que tienen una gran homología con los correspondientes de la cepa aviar A/duck/Ukraine/63 (H3N2).

PATOGENIA y ACCION PATOGENA

Determinantes de patogenicidad

La virulencia de una cepa de virus gripal se caracteriza por la infectividad o capacidad de infectar un determinado sistema celular o tejido, por su transmisibilidad o capacidad de difusión y en el caso de la gripe A también por la gama de hospedadores a los que es capaz de infectar.

La hemaglutinina es el principal responsable del poder patógeno de los virus gripales. La HA se une a los receptores que contienen ácido siálico presentes en las células del epitelio respiratorio a través del fragmento HA₁, más externo, portador de los epítomos más importantes. La HA provoca la fusión de las membranas celular y vírica y participa en la penetración, es el receptor para las células diana y de la eficacia de su escisión en dos subunidades (HA₁ y HA₂) por distintas proteasas celulares del huésped depende su virulencia. La HA se encuentra en los virus tras la replicación en forma de precursor y precisa activarse para ser capaz de infectar las células huésped. La activación de la HA se produce como resultado de la acción proteolítica por enzimas celulares del tipo de la tripsina y depende por lo tanto, de la existencia de un sistema enzimático adecuado para producir esa escisión en los tejidos en los que se multiplica el virus. La existencia de ese enzima en las células o tejidos depende en última instancia de la constitución genética del hospedador. La gama de posibles hospedadores dependerá por lo tanto de que la HA de un virus gripal pueda activarse en células de diversas especies animales

La activación de la HA por proteólisis supone la conversión de la subunidad precursora HA₀ en dos fragmentos, HA₁ y HA₂ (**figura 3**). La activación proteolítica y la glicosilación de la cadena polipeptídica tiene lugar en la célula sensible en el curso de la maduración del virus (proteólisis postraslacional). Algunas hemaglutininas de virus aviares (H5 y H7) son escindidas por proteasas muy ubicuas e infectan con extraordinaria eficacia células de distintos órganos y tejidos lo que ayuda a explicar su capacidad de franquear más fácilmente la barrera interespecie y la mayor virulencia.

La capacidad de escapar a la respuesta inmune mediante la deriva antigénica es obviamente un factor de virulencia importante sin embargo no explica la razón por la cual las variantes actuales del subtipo A (H3N2) son más patogénicas que los virus de tipo B y estas más que las del subtipo A (H1N1). Tampoco se explica porqué los virus H1N1 actuales son mucho menos patogénicos que sus antecesores responsables de la gran pandemia de 1918. El estudio de ARN viral de restos de fallecidos por la gripe de 1918 puede permitir dilucidar alguno de estos interrogantes.

Recientemente se ha descrito una elevada virulencia de algunas cepas aviarias; fuera del tracto respiratorio y entérico, asociada a la inserción de múltiples aminoácidos básicos próximos al sitio de escisión proteolítica de la HA. Esa característica facilita la escisión por otros enzimas además de la tripsina, localizada habitualmente en los tejidos y órganos diana del virus gripal, dotando al virus de capacidad para infectar otros tejidos distintos al respiratorio. Por consiguiente, la presencia de múltiples secuencias aminoácidas básicas en el dominio de escisión de la HA hace al virus infeccioso para diversos órganos no habituales incluidos corazón y cerebro.

La neuraminidasa interviene también en la infectividad, pero sus funciones biológicas son menos conocidas. En algunas cepas, la NA es necesaria para que la HA sufra la escisión proteolítica postraslacional indispensable para la infectividad. Se ha observado que alguna NA del tipo antigénico N1 es capaz de fijar plasminógeno y potenciar por el efecto proteasa de la plasmina el desdoblamiento de la HA de forma más eficaz, facilitando de esta forma la infección de otros tejidos distintos al respiratorio. Por otra parte, la NA juega un papel primordial en la liberación del virus de la célula y en la difusión del virus de célula a célula rompiendo los radicales de a. siálico que producen agregación del virus. Es una proteína que al romper la mucoproteína, facilita la difusión del virus por la mucosa respiratoria y también al resto del organismo.

Los determinantes de patogenicidad señalados son factores necesarios pero no suficientes para explicar el complejo problema de la patogenicidad de los virus gripales. Algunos de ellos guardan relación con la eficiencia de transmisión, se ha visto relación entre la infectividad de algunos virus aviarios a través del agua con el grado de salinidad de ésta, pH, tª, etc. En los virus humanos la transmisión puede guardar relación con el tamaño

de los aerosoles facilitando la propagación del virus, aspecto en el que parecen intervenir la acción de la NA, fluidificando el moco respiratorio, y las propiedades biológicas del virus (resistencia a los agentes externos, humedad relativa, etc.). Para que un virus gripal pueda infectar y sobre todo pueda difundir en una especie animal determinada, debe poseer una constelación de genes óptima. Además los virus precisan de un periodo de varios años, tras el salto de especie, en el que se suceden mutaciones secuenciales que adaptan mejor el virus a la especie huésped. Los estudios realizados indican que la aparición del ancestro común de los virus porcinos y humanos H1N1 ocurrió entre 1905 y 1914 mientras que la pandemia de gripe española tuvo lugar en 1918, de igual forma la adquisición del gen de la H3 fue alrededor de 1965 y la gripe Hong Kong fue en 1968. Dichas mutaciones afectan tanto a las glicoproteínas superficiales como a las proteínas internas.

Todas las experiencias de recombinación realizadas permiten asegurar que la patogenicidad no depende de un solo gen, sino de una determinada combinación en la que intervienen los ocho segmentos genómicos, jugando un importante papel, además de los genes de la HA y de la NA, los segmentos que codifican el complejo ARN polimerasa y la NP.

Patogenia

El virus llega a la mucosa respiratoria por vía aérea, donde puede ser neutralizado por los anticuerpos locales de infecciones anteriores; también contribuyen a la defensa los inhibidores inespecíficos existentes en el moco y sistema mucociliar. La infección se inicia por la fijación del virus a los receptores mucoprotéicos de las células del epitelio columnar respiratorio, donde tiene lugar una intensa replicación en las 48- 72 horas siguientes y durante un periodo más largo en niños. Desde aquí el virus es eliminado en grandes dosis infectantes por microaerosoles (gotitas de Pflügge) emitidos al ambiente al hablar, estornudar o toser. Este aspecto implica cierta resistencia del virus en el medio ambiente favorecido por las condiciones de humedad relativa y temperatura, concentración del virus en las secreciones respiratorias y tamaño de los aerosoles formados. Todos estos factores facilitan la flotabilidad en el ambiente de microaerosoles cargados de virus infecciosos. El grado e intensidad de replicación del virus en la mucosa respiratoria, la acción de la NA viral facilitando la ruptura de la mucoproteína de las secreciones y la formación de gotitas

muy pequeñas cargadas de virus son propiedades biológicas distintas entre unas cepas y otras sobre todo entre virus de origen animal aviar, mamíferos y humanos.

El virus gripal produce infecciones respiratorias que, aunque raramente tienen una fase de viremia, provocan una repercusión sistémica importante. El virus desde la mucosa respiratoria difunde por contigüidad ocasionando un proceso inflamatorio con necrosis del epitelio ciliado del tracto respiratorio superior; también puede afectar al tracto respiratorio inferior (bronquios, bronquiolos y alvéolos) produciendo serias complicaciones broncopulmonares y neumonía gripal. La enfermedad tiene una incidencia similar en todas las edades, aunque suele ser más frecuente en los niños y más grave en las edades avanzadas, lo que se relaciona con las experiencias antigénicas previas, la patología subyacente y el importante papel de colegios y guarderías como factores de agregación que favorecen la difusión.

La gravedad de la gripe varía ampliamente en función de la cepa causal y de los factores de riesgo de complicaciones presentes en los individuos infectados.

Cuadros clínicos

La gripe no complicada o el síndrome gripal es el cuadro más frecuente producido por los virus gripales A y B. El virus C produce cuadros respiratorios de vías altas sin la repercusión sistémica de la gripe y en general más banales.

En los primeros días las manifestaciones sistémica predominan sobre las respiratorias. El espectro de síntomas de la gripe es muy amplio aunque los cuatro síntomas básicos son: fiebre, cefalea, quebrantamiento general y síntomas respiratorios (**Tabla 6**). El diagnóstico clínico es fácil cuando existe un ambiente epidémico y notificación de aislamiento de virus por el laboratorio, pero resulta más difícil fuera de periodos epidémicos o en instituciones cerradas. Los síntomas pueden cambiar en función de parámetros tales como la edad, hábitos de la persona, los procesos gripales sufridos anteriormente, la virulencia de las cepas y los antecedentes médicos. Entre estos últimos cabe destacar los procesos cardiopulmonares crónicos, otras patologías crónicas, la inmunosupresión, el tabaquismo y el embarazo.

Se debe prestar atención a las complicaciones que la gripe puede presentar en edades extremas de la vida (otitis en niños y neumonía en ancianos) así como su influencia

en el curso de procesos crónicos de las vías aéreas (asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, etc.) y en otros procesos crónicos de distintos órganos y sistemas.

La infección gripal puede producir también formas ambulatorias leves semejantes al resfriado común, bronquitis aguda o faringitis e infecciones inaparentes. Las formas leves e inaparentes parecen ocurrir por la inmunidad parcial conferida por infecciones previas.

Gripe en adultos. La gripe se caracteriza por su comienzo brusco tras un periodo de incubación breve (24-48 h) que permite en algunos casos epidémicos “identificar” la fuente de contagio entre los contactos. El enfermo debuta con sensación distérmica importante y escalofríos que normalmente le obligan a encamarse.

La fiebre suele ser el signo más frecuente entre los casos con diagnóstico de laboratorio confirmado (**Tabla 6**) y generalmente se sitúa entre los 38° a 39’5° C. Hasta un 20% de los casos sufren fiebre o picos febriles de 40°-41°C. La temperatura más alta se observa en las primeras 24 horas descendiendo luego 0’5° a 1°C. La fiebre suele durar por término medio 3 días, con un rango entre 1 y 8 días, observándose a veces una curva bifásica febril tras una breve remisión. La cefalea suele ser intensa y posterior al inicio de la fiebre destacando entre los síntomas iniciales, la anorexia y las mialgias que afectan principalmente a la espalda y miembros acentuándose al moverse el enfermo en la cama o con la presión de las masas musculares a la palpación.

Los síntomas iniciales se acompañan de sintomatología respiratoria que varía de unos enfermos a otros y de unas epidemias a otras. Generalmente se traduce en un cuadro de tos no productiva que puede dar paso a congestión nasal a los tres primeros días produciéndose raramente ronquera o dolor retroesternal. La auscultación pulmonar evidencia en el 10% de los pacientes roncus y sibilancias que revelan la participación bronquial. En ancianos y niños puede observarse obstrucción nasal similar a la que ocurre en el catarro común pero de menor intensidad.

En el 10%-15% de los casos se palpan ganglios cervicales pequeños, rodaderos y blandos. Otras manifestaciones clínicas son: dolor ocular retroorbital, fotofobia, lagrimeo y sensación de quemazón ocular. En el 2-3% de los casos confirmados de gripe se producen manifestaciones digestivas, siendo más frecuentes los vómitos, la diarrea en menor proporción, y los dolores abdominales raros; generalmente los enfermos refieren

estreñimiento en el curso de la enfermedad.

La evolución del cuadro es generalmente benigna y autolimitada, el periodo de máxima intensidad del cuadro sistémico y síntomas mayores dura entre tres y cuatro días por término medio, aunque la astenia y la tos pueden persistir una e incluso dos semanas más. En las formas leves falta la sintomatología típica y puede manifestarse como traqueobronquitis, faringitis, resfriado vulgar o simplemente como un cuadro febril de instauración brusca sin síntomas respiratorios. En ausencia de ambiente epidémico estas presentaciones confunden el diagnóstico con otros cuadros febriles.

Gripe en niños. Los niños y adolescentes son los primeros afectados en las epidemias de gripe y la infección gripal ocasiona fiebre que tiende a ser más elevada. Los neonatos a menudo presentan síntomas poco específicos con apnea y rechazo del alimento y cuadros respiratorios más semejantes al croup y a la bronquiolitis. En casi la mitad de los niños menores de cuatro años se aprecia un grado importante de somnolencia y letargia. En más del 20% de los niños hospitalizados, menores de cinco años, se han podido documentar cuadros convulsivos y una mayor incidencia de otitis media (4-5%). En lactantes menores de seis meses se pueden dar abdominalgias, vómitos y diarrea. El síndrome sistémico gripal puede ser especialmente intenso y postrante en niños pequeños encontrándose la CPK elevada y la GOT discretamente elevada como manifestaciones enzimáticas de la afectación muscular. La frecuencia de complicaciones y la gravedad en niños guarda relación con la menor capacidad de respuesta a la infección y la ausencia de experiencias previas gripales.

Gripe en grupos de especial riesgo. Algunas manifestaciones de la gripe y complicaciones solo se producen en pacientes con ciertas enfermedades de base. La exacerbación del asma en asmáticos, el agravamiento en la fibrosis quística, las cetosis en diabéticos, responden a este planteamiento. En otros casos el padecimiento de la infección gripal puede resultar en un incremento de la mortalidad o de morbilidad grave (enfermos crónicos cardiopulmonares, fumadores).

En enfermos cardiopulmonares la gripe se asocia a un exceso de mortalidad y mayor incidencia de agudizaciones de síndromes cardiovasculares, referidas a fracasos de cuadros isquémicos cardíacos y como factor de riesgo para infarto de miocardio en arteriosclerosis.

En los periodos epidémicos las muertes de pacientes con EPOC pueden aumentar hasta un 50%. En los pacientes diabéticos se ha observado un aumento de hospitalizaciones por cetosis y mayor riesgo de muerte durante las epidemias de gripe que en el resto del año. La gripe Asiática y sucesivas epidemias pusieron de manifiesto un incremento en el porcentaje de muertes por diabetes, oscilando desde un 7'9% a un 30% más. En diabéticos el riesgo de neumonía asociada a gripe es 1'7 veces mayor que en la población general. La combinación de neumonía gripal y diabetes es especialmente grave y la mortalidad en estos casos muy importante

Los pacientes inmunodeprimidos pediátricos y adultos, trasplantados, enfermos con síndromes linfomieloproliferativos malignos, especialmente los sometidos a terapia inmunosupresora, tienen una mayor persistencia y excreción del virus gripal y sufren con mayor frecuencia neumonía primaria viral. En transplantados la mortalidad se asocia con el grado de neutropenia. No se ha demostrado un mayor riesgo de rechazo en receptores de transplante sólido. La información respecto a pacientes con SIDA o infección VIH es escasa. En estos individuos se ha comunicado mayor duración del proceso, afectación respiratoria más evidente y curso más prolongado.

En embarazadas se ha comprobado una mayor incidencia de complicaciones entre el segundo y el tercer trimestre de la gestación pero no se ha probado riesgo añadido de malformaciones congénitas.

Complicaciones de la gripe. Las complicaciones de la gripe se presentan en todas las edades, sin embargo son más frecuentes en personas con patologías crónicas subyacentes, inmunosupresión o edad avanzada (>65 años). Algunas, como el S. de Reye es exclusivo de niños y jóvenes. Las más frecuentes son las respiratorias, y entre las no respiratorias se incluyen manifestaciones cardiovasculares, musculares, nerviosas, incluyendo el SNC, renales, endocrinas, gastrointestinales y hemáticas.

La bronquitis aguda es la complicación respiratoria más frecuente y se asocia a dos factores: pacientes *naive* para el virus gripal y edad avanzada. La más grave es la neumonía primaria viral, más frecuente con los virus A. La sintomatología gripal de los primeros días da paso a fiebre alta que no remite, tos, disnea y cianosis; la gasometría sanguínea revela hipoxia acusada. La radiografía de tórax muestra infiltrados bilaterales difusos de

localización peribronquial sin consolidación. El deterioro del enfermo y de la función pulmonar es rápido y la media de supervivencia es inferior a la semana, la mortalidad es muy elevada.

La neumonía secundaria bacteriana se debe a la sobreinfección bacteriana sobre la lesión pulmonar producida por el virus gripal. La sintomatología es superponible a las neumonías bacterianas y suele ocurrir tras una pequeña remisión de la sintomatología gripal 11 a 14 días después del comienzo de la enfermedad gripal. La forma bronconeumónica es la más frecuente y grave y ha sido la responsable de más del 80% de las muertes ocurridas en las grandes pandemias. Se observan casos en los que se producen neumonías mixtas víricas y bacterianas y se han descrito cuadros de empiema, absceso pulmonar, neumotórax y enfisemas secundarios a gripe con una incidencia menor al 0'1%.

Entre las demás complicaciones deben tenerse en cuenta las cardíacas. Hasta el 80% de los casos hospitalizados por gripe y el 40% de otros pueden hallarse alteraciones transitorias (24 horas) del ECG (inversión de T, elevación de ST, ritmo nodal, etc.) que pueden persistir meses o años y unidas a alteraciones previas subyacentes ser causa de arritmia grave o cardiomiopatía congestiva.

Las complicaciones más frecuentes en niños son: la otitis media, traqueobronquitis, laringotraqueitis, y bronquiolitis.

El **síndrome de Reye** es una encefalopatía con degeneración hepática grasa que ocurre en la infancia (2 a 18 años) y cursa con una alta mortalidad (10-40%). Aunque se ha asociado a muy diversas infecciones víricas, sobre todo a varicela, se presenta fundamentalmente como una complicación de la gripe B y, en menor medida de la gripe A. La incidencia tras la infección gripal se ha estimado en 0,3 a 0,8 casos por 100.000 menores de 18 años; existiendo una forma leve del síndrome mucho más frecuente. La asociación entre este síndrome y el tratamiento con ácido salicílico desaconseja la administración de derivados salicílicos en los niños con gripe. Por último, son complicaciones raras descritas en la gripe la encefalitis y encefalopatía, síndrome de Guillain-Barré, miositis, fracaso renal, síndrome de coagulación intravascular, y el síndrome hemofagocítico

Durante los grandes brotes epidémicos de virus A, la gripe es una importante causa de infecciones nosocomiales y en instituciones cerradas. La edad y la institucionalización

son los factores más influyentes, los internados en residencias geriátricas constituyen un grupo especialmente vulnerable y en menor medida los de centros de internamiento psiquiátrico, hospicios y cuarteles.

INMUNIDAD

La inmunidad adquirida tras la infección gripal es específica del subtipo y de la variante responsable. Depende fundamentalmente de la respuesta humoral frente a los antígenos superficiales del virus, sobre todo frente a la HA y en menor proporción la NA, siendo menos conocido el papel que juega la inmunidad de base celular tan importante en otras infecciones víricas.

Tras la primoinfección natural aparecen anticuerpos en el suero de los pacientes frente a la HA y la NA así como frente a la NP y la proteína M. Estos últimos tipos específicos y de un valor protector limitado resultan de utilidad para el diagnóstico por fijación del complemento. Los acs antiHA son la base de la inmunidad protectora humoral en la gripe; neutralizan la infectividad del virus por bloqueo del dominio de adhesión en la subunidad HA₁ y duran de por vida a títulos variables pero superiores a 1/40. Los acs anti-NA aparecen a menor título y algo más lentamente y su efecto protector se basa en la limitación de la difusión del virus en el tracto respiratorio y al resto del organismo ya que bloquean la liberación de los virus tras el ciclo replicativo. Tanto los acs HA como frente a la NA son específicos de cepa o variante y algo menos de subtipo, esta especificidad tan estrecha de los principales acs protectores explica en gran parte la susceptibilidad a la infección por nuevas cepas variantes de virus gripales.

La respuesta humoral producida en la infección natural produce anticuerpos circulantes en suero y secretorios en la mucosa respiratoria. La aparición de IgA en el epitelio mucoso del tracto respiratorio constituye una de las líneas de defensa principales frente a la infección. Se admite que la presencia de títulos $\geq 1/40$ por reacción de inhibición de la hemaglutinación (RIH) en suero, o $\geq 1/8$ por reacción de neutralización en secreciones nasales, protegen frente a la infección por el virus homólogo en niños y adultos sanos; sin embargo en ancianos la protección total puede precisar títulos séricos superiores.

La inmunidad conferida por la respuesta humoral frente a la HA es de larga duración. La distribución por edades demuestra más frecuentemente la presencia de

anticuerpos frente a subtipos A/H1N1 en personas mayores como consecuencia de infecciones pasadas. Sin embargo, la deriva antigénica que muestran las variaciones menores del virus limitan mucho la duración de la inmunidad frente a la infección gripal que, según la importancia del deslizamiento antigénico, se ha cifrado entre 1 y 5 años. Por otra parte, las infecciones repetidas por variantes menores de un mismo subtipo, aumentan la resistencia a la infección por dicho subtipo.

En el caso de la gripe A, la respuesta serológica esta influida durante toda la vida por la primera experiencia antigénica frente a un virus gripal. Por esta razón los estímulos provocados por la infección con variantes menores (Ag relacionados) producen, además de la respuesta específica contra la variante actual, una respuesta anamnésica frente al subtipo que causó la primoinfección gripal en dicho individuo (doctrina del “pecado original” antigénico gripal). Los estímulos sucesivos, si están producidos por subtipos nuevos (Ag no relacionados) ocasionan una nueva respuesta primaria. En resumen, la respuesta inmune humoral tanto de tipo sérico como secretorio es la responsable de la protección frente a la infección gripal y del padecimiento de la enfermedad.

La respuesta inmunitaria celular juega un importante papel en la patogenia de la infección gripal y en la recuperación de la enfermedad ya establecida. En el curso de la infección gripal se observa un incremento de los mecanismos de la inmunidad innata y con frecuencia inmunosupresión de algunos mecanismos de la inmunidad celular. La respuesta inmunitaria celular está mediada por células T CD4+, con restricción CMH clase II, fundamentalmente subtipo específicas, y su función principal parece ser la colaboración para la producción de anticuerpos. Las células T CD8+ con restricción CMH clase I, son tipos específicas dirigidas preferentemente a los Ag NP y M. Las células NK no son virus específicas pero en la fase aguda aumenta considerablemente su actividad y la presencia de alfa y beta interferón que se correlaciona con la disminución de la carga vírica.

Tras la vacunación con virus inactivados se produce una respuesta humoral frente a los antígenos superficiales del virus similar a la que ocurre tras la infección natural. Las seroconversiones que se obtienen tienen una amplitud e importancia variable en función de la edad, función inmune de la persona, enfermedades crónicas subyacentes y cepas implicadas. La respuesta en este caso es fundamentalmente de tipo sérico con escasa o nula

producción de anticuerpos locales de tipo secretorio y escasa respuesta celular.

La respuesta celular tras la vacunación con virus inactivados es poco conocida. Recientemente se ha postulado que la vacuna con virus fraccionados en los ancianos produce una activación de linfocitos T_H menor que la vacuna con virus enteros, lo que podría ser un aspecto a tener en cuenta para la vacunación de este grupo de población.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

El síndrome gripal es un proceso que no puede ser diagnosticado únicamente por la clínica salvo cuando existe evidencia epidémica debidamente contrastada. Otros virus como VRS, parainfluenza, rinovirus, adenovirus o enterovirus pueden ocasionar síndromes semejantes que confundan el diagnóstico clínico.

El diagnóstico virológico tiene interés por distintas razones además de las puramente clínicas (**Tabla 7**) entre las que destaca la vigilancia epidemiológica que se debe mantener sobre una enfermedad de potencial pandémico indudable. El diagnóstico clínico de síndrome gripal es fácil pero no presupone indicación etiológica. Durante las epidemias la sospecha etiológica esta mejor fundada en la clínica; por ello es importante que la información de aislamientos de gripe se difunda rápidamente a los sanitarios.

El diagnóstico virológico se debe dirigir en la práctica a la confirmación de los primeros casos de un brote, al estudio de los casos graves y complicaciones, sobre todo en pacientes hospitalizados, pediátricos e inmunodeprimidos. Aunque desde 1968 no aparece una cepa realmente pandémica se debe recordar que cualquier virus gripal aislado en cualquier parte del mundo puede ser candidato para la elaboración de la vacuna anual.

El diagnóstico de laboratorio de Gripe puede hacerse por métodos directos e indirectos (serológicos). Los primeros ofrecen una mayor rapidez y sensibilidad mientras que los segundos permiten el diagnóstico de casos en los que no sea posible el aislamiento o la detección del virus. Los métodos de diagnóstico indirecto también sirven para la realización de estudios epidemiológicos y de respuesta biológica a la vacunación.

Entre los métodos de diagnóstico directo cabe distinguir aquellos que permiten la recuperación y cultivo posterior del virus y otros, de desarrollo más reciente, que no permiten su recuperación y posterior cultivo en el laboratorio. En la práctica es conveniente

usar una combinación de ambos que se adapte a las necesidades del laboratorio y la clínica.

Recogida de muestras. El momento óptimo de recogida de muestras está en los tres primeros días del comienzo de los síntomas. Las muestras de elección pueden ser frotis faríngeos o nasofaríngeos, aspirados nasofaríngeos y lavados nasales, estos últimos de especial utilidad en niños. Otras muestras más profundas como lavados broncoalveolares o aspirados traqueales se realizarán en función de la clínica.

El transporte de las muestras debe hacerse utilizando cualquier medio de calidad utilizado en virología, es suficiente que contenga un tampón, albúmina sérica bovina, antibióticos y antifúngicos. La conservación puede hacerse a 4°C durante 24-48 horas y si el cultivo no puede hacerse en las 48 horas de su llegada al laboratorio a -70°C.

Cultivo y aislamiento. Las células comúnmente utilizadas son las MDCK y con menor sensibilidad las Vero y MRC-5. Para el cultivo de virus C existe una línea de melanoma humano. El virus A está menos adaptado que el B a crecer en células derivadas de mamíferos y su acción citopática es menor. En el aislamiento clásico se utiliza también el cultivo en embrión de pollo que ha sido abandonado por muchos laboratorios por su complejidad y debido a la menor sensibilidad de las cepas A (H3) y A (H1) que circulan actualmente debido a cambios en el sitio de unión al receptor de la HA. Además del cultivo clásico, en los laboratorios hospitalarios se realiza el cultivo rápido por centrifugación/cultivo (*shell vial*) utilizando las mismas líneas celulares y revelado posterior con monoclonales anti A o B. Este sistema diagnóstico permite el aislamiento en 24-48 horas con ligera merma de la sensibilidad respecto a los métodos clásicos. En la **figura 6** se muestra el algoritmo de diagnóstico directo por cultivo.

Diagnóstico rápido Estos métodos de diagnóstico directo se basan en la detección de componente estructurales del virus por técnicas inmunológicas como el enzoinmunoanálisis (EIA), la inmunocromatografía capilar (ICC), distintas modalidades de inmunofluorescencia (IF), y de amplificación genómica (PCR). Algunos (EIA, ICC) permiten el diagnóstico a la cabecera del enfermo y sirven para poder instaurar un tratamiento precoz o medidas de profilaxis urgentes. Pueden constituir una primera línea de diagnóstico pero no sustituir a los métodos de diagnóstico directo basados en el cultivo. Los requerimientos de calidad de las muestras son críticos sobre todo para algunas modalidades

de ICC e IF, está última técnica precisa de células morfológicamente conservadas y para ello es más adecuado el lavado nasofaríngeo que el frotis. En general la calidad de la muestra en los métodos rápidos influye decisivamente en su sensibilidad. Las técnicas de RT-PCR para diagnóstico utilizan iniciadores para segmentos de la NP y la proteína M, y para el tipado y subtipado de hemaglutininas de virus A, de regiones de la H1 y H3. Recientemente se han ensayado PCR multiplex que permiten diagnóstico y tipado de virus gripales incluido el virus C y otros virus respiratorios. Estas técnicas pueden tener un rápido desarrollo en la virología clínica durante los próximos años.

Diagnóstico serológico El diagnóstico se basa en la demostración de seroconversión o aumento superior o igual a cuatro veces entre dos sueros del paciente recogidos en la primera semana del inicio de los síntomas y diez a quince días después de la primera extracción. Cuando se precise comprobar la respuesta postvacunal las muestras de suero se deben recoger antes de la vacunación y tres o cuatro semanas posteriores a la fecha de vacunación, lapso necesario para una respuesta inmune completa.

Las técnicas más empleadas son la de Fijación de Complemento (RFC) y la de inhibición de la hemaglutinación (RIH); la primera solo permite el diagnóstico de tipo (A y B) y adolece de adecuada sensibilidad sobre todo para las seroconversiones. Por esta razón, títulos ≥ 64 en ambiente epidémico o con clínica típica son significativos. La RIH es subtipo específica y no se utiliza habitualmente en el diagnóstico hospitalario sin embargo es muy útil en estudios seroepidemiológicos y de respuesta a la vacunación. En la RIH son elementos críticos la fuente de obtención del Ag, la especie animal de la que se obtienen los hematíes y el tratamiento para eliminar los inhibidores inespecíficos. Se ha observado mayores títulos de acs inhibidores de la hemaglutinación al utilizar Ag obtenidos de cultivos celulares frente a los de embrión de pollo, hematíes de gallina o pavo y tratamiento con RDE (*receptor destroying enzyme*) de *Vibrio cholerae*.

Las técnicas de diagnóstico indirecto, obviamente, no permiten un diagnóstico rápido de la enfermedad, pero sirven cuando otros procedimientos fallan o para documentar casos en los que la sospecha clínica ha sido tardía. Se han desarrollado EIAs, más sensibles que la RFC, basados en Ag de NP y otros Ag internos tipo específicos que permiten detectar la producción de IgM e IgA específicas frente a virus A y B.

La reacción de neutralización (RN) y la inmunodifusión radial tienen un empleo más restringido. Esta última se usa más como método directo semicuantitativo de estandarización de la concentración de HA de las vacunas

Recomendaciones diagnósticas. Cada laboratorio debe diseñar su propio esquema diagnóstico en función de sus características dotacionales y sanitarias. En general es oportuno combinar un método rápido de diagnóstico antigénico o molecular con otro sistema rápido de cultivo que permita recuperar el virus. El cultivo de lavados nasofaríngeos o broncoalveolares permite el aislamiento vírico en 24-48 horas por el método de *shell-vial*. Se pueden utilizar en un mismo vial distintas líneas celulares (MDCK, Vero; Hep2) que permitan el crecimiento de otros virus respiratorios ampliando el espectro diagnóstico a un coste aceptable. La reproductibilidad de resultados debe asegurarse con controles periódicos de reactivos, líneas celulares y virus. Finalmente las muestras deben conservarse adecuadamente hasta la emisión del informe definitivo y fomentar la intercomunicación y el diagnóstico a distintos niveles de especificidad entre redes de laboratorios hospitalarios, regionales y de referencia.

TERAPIA ANTIVIRAL ESPECÍFICA

El tratamiento del síndrome gripal en un niño o adulto sano no suele requerir tratamiento específico, siendo suficiente el reposo y la administración de antitérmicos y analgésicos en la mayoría de los casos. En los niños se desaconseja el tratamiento con ácido acetil-salicílico por su asociación con el síndrome de Reye. La utilización de antibióticos puede estar indicada en personas con posibilidades de sufrir complicaciones pulmonares bacterianas.

Los antivíricos específicos frente a la infección por virus gripales pertenecen a dos familias distintas: aminos cíclicos (ACs) e inhibidores de la neuraminidasa (INAs). La amantadina y la rimantadina son aminos cíclicos sintéticos que actúan por bloqueo del canal iónico de la M2 (**figura 5**), dicho mecanismo de acción justifica que sean activas solo frente al virus A ya que los virus B tienen un análogo de dicha proteína distinto a los virus A (ver estructura). Su utilización terapéutica mejora sensiblemente el espectro de síntomas gripales de forma más efectiva que los tratamientos sintomáticos, sin embargo la estrecha franja entre la dosis terapéutica y la que produce efectos secundarios justifica; en parte, su

limitado uso terapéutico. La amantadina y rimantadina están indicadas en casos graves (ej neumonía vírica) y en sujetos con importantes factores de riesgo o en el curso de brotes de gripe en instituciones cerradas sin una completa y adecuada cobertura vacunal. La dosis debe ser ajustada en función de características individuales; en adultos sanos 100mg dos veces al día durante tres a cinco días. En ancianos no sobrepasar los 100mg diarios e incluso menos si se sospecha función renal alterada. En pacientes hemodializados o con trastorno renal ajustar dosis individuales menores en función del aclaramiento renal, incluso pautas con dosis en días alternos. Se han descrito efectos secundarios sobre el SNC y aparición de cepas resistentes y aparición de resistencias cruzadas entre ambos quimioterápicos en el curso del tratamiento.

La quimioprofilaxis con antivíricos es una alternativa a la vacunación antigripal en circunstancias determinadas. La quimioprofilaxis se realiza con amantadina o rimantadina aunque esta última, con mejor tolerancia y propiedades farmacocinéticas, no se encuentra comercializada en todos los países. Tanto el uso preventivo de estos antivíricos como su empleo terapéutico, está bien definido (**tabla 8**). Ante una amenaza epidémica por virus A, la quimioprofilaxis puede estar indicada en las personas en las que la vacuna esté contraindicada, en las que tengan una severa inmunodeficiencia, incluidos los pacientes VIH positivos, en pacientes en los que cabe esperar una mala respuesta a la vacuna, como los hemodializados, en personas de riesgo que no hayan sido vacunadas y a título individual. Tanto la quimioprofilaxis como el tratamiento con amantadina han tenido poca difusión. No obstante, una epidemia moderada o severa ofrece muchas circunstancias en que su uso puede ser muy útil.

La más reciente introducción en el arsenal terapéutico contra la gripe lo constituyen los inhibidores de la NA. Estos antivirales actúan específicamente inhibiendo y bloqueando los sitios activos del enzima impidiendo de este modo la liberación de los nuevos virus de la célula infectada y bloqueando su difusión (**figura 4**). Por ello los inhibidores de la NA son activos frente a todos los virus A y B ensayados incluso cepas animales. Actualmente hay dos fármacos de esta familia comercializados en distintos países.

El zanamivir fue la primera molécula sintetizada que al tener baja biodisponibilidad oral, se administra por inhalación mediante un dispositivo suministrado con el fármaco que

permite la llegada del producto activo a la mucosa respiratoria. La dosis recomendada para el tratamiento son dos inhalaciones diarias durante 5 días, recomendándose el inicio terapéutico en las primeras 24 h. de los síntomas para lograr la máxima eficacia. Para uso profiláctico se recomienda una inhalación diaria. Dada su nula absorción no hay necesidad de reducción de dosis en enfermos renales. Su uso está indicado en adultos con buen nivel de conciencia y adolescentes >12 años. Reduce el periodo de estado de la gripe entre 1-3 días y las complicaciones.

El oseltamivir es otro INA que tras ingesta oral se absorbe y metaboliza a oseltamivir-carboxilato, su principio activo. Se elimina por filtrado glomerular y secreción tubular y tiene una biodisponibilidad del 80%. La dosis recomendada es de 75 mg dos veces al día durante 5 días y para profilaxis una sola dosis diaria. Es necesario disminuir la dosis en pacientes con aclaramientos de creatinina inferiores a 30ml/min. Ninguno de los INAs tienen acciones sobre el citocromo p450 y no están descritas interacciones con otros antivirales.

Diversos y prometedores antivíricos cuyas dianas son la proteína M2, la ARN polimerasa y otros inhibidores de la NA (RWJ270201) se encuentran actualmente en fase experimental, los ensayos de zanamivir y oseltamivir continúan y es probable que la respuesta de anticuerpos y la acción de los antivirales tenga efecto sinérgico sobre el virus.

EPIDEMIOLOGIA y ECOLOGÍA

La epidemiología moderna de los virus gripales descansa sobre tres pilares fundamentales: la circulación de los virus en animales, la transmisión interespecie y la variabilidad de los virus por los mecanismos de mutación y recombinación genética. La epidemiología de la gripe, como enfermedad humana, se ha comprendido mejor a la luz de los descubrimientos genéticos y bioquímicos llevados a cabo en los últimos dos decenios.

Los estudios intensivos emprendidos por Webster sobre el reservorio animal de la gripe han permitido ampliar el conocimiento que tenemos actualmente sobre la génesis de virus capaces de infectar al hombre (**figura 7**). Desde el reservorio animal principal en las aves acuáticas se producen transmisiones esporádicas a huéspedes intermediarios, animales salvajes o domésticos (cerdos, caballos, aves de corral) en los que a veces pueden ocurrir infecciones dobles que darán lugar a recombinaciones genéticas. El virus en estos

huéspedes sufre de forma rápida y progresiva una serie de mutaciones acumulativas en toda su constelación genómica (genes de antígenos superficiales e internos) que adaptan mejor al virus para multiplicarse en huéspedes mamíferos.

Los virus gripales A pueden pasar desde los huéspedes intermediarios mamíferos o directamente desde las aves al hombre que sufrirá la infección viral por un nuevo tipo de virus. El hombre sufrirá la infección gripal por un nuevo subtipo de virus como un caso esporádico o como un brote de transmisión interespecie si hay varios casos en un corto espacio de tiempo como sucedió en el brote de gripe A/duck/Hong Kong/156/97 (H5N1). Si el nuevo subtipo es capaz de transmitirse de persona a persona (transmisión interespecie humana) tendremos una cepa con potencial pandémico introducida en humanos (salto de especie).

Existen dos grandes ecosistemas en la gripe: uno constituido por los animales en el que se incluyen el reservorio principal y los mamíferos intermediarios en los que el virus ha tenido una introducción más reciente y otro ecosistema humano constituido por los virus gripales que han atravesado con éxito la barrera interespecie desde el reservorio animal y continúan su difusión interhumana. Resulta evidente desde un aspecto puramente ecológico y zoológico que la gripe sea considerada como una epizootia de aves y mamíferos entre los que se incluye el hombre.

Gripe animal

El estudio de la ecología de los virus gripales resulta fundamental para el conocimiento de la historia natural de la gripe A. Los virus gripales A están ampliamente difundidos en la naturaleza en diferentes especies de animales pero principalmente en las aves acuáticas que constituyen su reservorio natural. La mayoría de las aves acuáticas migratorias estudiadas (patos, ánades, pardelas, garzas, gaviotas, charranes y otras golondrinas marinas etc.) se infectan de forma asintomática por el virus gripal A, multiplicándose en las células del epitelio intestinal y eliminándose en grandes dosis por las heces. Este mecanismo de transmisión fecooral es absolutamente distinto a la transmisión interhumana de los virus gripales. Con frecuencia estas infecciones inaparentes son mixtas, lo que hace posible la aparición de recombinaciones genéticas.

Las aves salvajes, y en particular los patos y otras especies migratorias afines,

constituyen el reservorio central de la gripe A. Más que un reservorio en el sentido epidemiológico clásico representa un depósito natural de un amplio "pool" de genes; un reservorio o banco genético en el que los segmentos genómicos y sus correspondientes antígenos parecen estar en situación estática evolutiva. En las aves se han demostrado todos los tipos antigénicos de HA y de NA que se conocen (**Tabla 5**) y en ellas se dan frecuentes ocasiones para la recombinación genética, debido a la transmisión por vía fecal y la difusión por todo el mundo como consecuencia de las migraciones de ánales salvajes.

El mantenimiento de los virus gripales A en aves acuáticas se hace por mecanismos no bien comprendidos fruto de la evolución del virus en esas especies animales. Entre las explicaciones propuestas se ha mencionado la circulación continua de virus mediante infecciones periódicas de los animales jóvenes no inmunes, la transmisión interespecie de los virus en distintas especies acuáticas, la conservación o mantenimiento de virus en el agua o el hielo y la circulación permanente de los virus gripales en áreas tropicales y subtropicales.

Las aves domésticas constituyen un reservorio relacionado con el anterior. La gripe aviar es una enfermedad generalmente mortal de las aves domésticas (pollos, pavos, patos y otras) con un cuadro respiratorio y nervioso pero también puede cursar en ellas como una infección asintomática. Todo indica que las aves domésticas constituyen un reservorio secundario de un ecosistema mucho más importante en las aves salvajes.

Diversos mamíferos sufren epizootias importantes de gripe A, en particular los cerdos y caballos y en menor medida algunos mamíferos marinos (focas, ballenas). Se han descrito infecciones esporádicas en perros, gatos, bóvidos y monos; así como casos en murciélagos, visones y renos probablemente al entrar en el ciclo ecológico de las aves salvajes.

Entre los mamíferos, el ganado porcino ocupa un lugar destacado por la posibilidad de infecciones más persistentes por determinados subtipos y por constituir en ocasiones el "vaso o coctelera" de recombinación genética que ayuda a franquear la barrera de especie hasta la infección en humanos ya que el cerdo es susceptible a la infección por cepas humanas y aviares. El primer virus gripal A fue transmitido por Shope al cerdo y se han aislado distintos linajes de H1N1 en EEUU y Europa. También se han aislado virus del

subtipo H3N2 en cerdos de todo el mundo y se ha comprobado la aparición de cepas procedentes de recombinantes de virus de pavos y cerdos. El caballo es otro mamífero doméstico en el que se dan brotes de gripe por cepas de virus A específicas de dicha especie

La transmisión interespecies de los virus gripales A es un hecho comprobado, pero la adaptación al huésped es un escalón decisivo para continuar la difusión intraespecie de los virus que hacen el salto de especie. Una de las hipótesis postuladas es la aparición de mutaciones “mutadoras” por la cual un virus puede dar lugar en el huésped animal a un amplísimo número de variantes que permite seleccionar la mejor adaptada a dicho huésped. Dicha mutación, que no supone una ventaja en condiciones normales, se pierde cuando se establece el nuevo linaje.

Los casos de infección humana con un virus de origen animal son eventos esporádicos pero posibles (**tabla 9**) y el episodio de Hong Kong así lo demuestra. Las recombinaciones se producen continuamente entre las aves acuáticas y probablemente en menor medida en los mamíferos. Solo los virus recombinantes que disponen de una constelación de genes adecuada para su replicación y transmisibilidad al hombre pasan a éste, eso no es óbice para que algunos de los casos diagnosticados hayan sido mortales.

Los virus B tienen un reservorio exclusivamente humano. Sin embargo Osterhaus y virólogos holandeses han descrito recientemente aislamientos de virus B y presencia confirmada de anticuerpos frente a dichos virus en focas, pruebas de una circulación restringida de este virus en esos mamíferos. Estos hechos que pueden ser consecuencia del contacto con humanos, como consecuencia del cuidado y atención especial que reciben las focas en dicho país, refuerzan el concepto del salto de especie característico de los virus gripales y justifican la necesidad de vigilancia sobre la gripe animal.

Gripe humana

Los virus gripales A humanos, que circulan actualmente, proceden de un ancestro aviar que emergió hace aproximadamente 100 años, sin embargo la gripe y los virus gripales existen desde muchos siglos antes. Se ha sugerido que el salto de especie desde el reservorio aviar al humano es un evento raro que ocurre cada cierto tiempo. Cada vez que un virus aviar llega a un huésped mamífero y establece un linaje estable se enfrenta a una

enorme presión selectiva de tal forma que siglos más tarde las recombinaciones entre su genoma y otro de más reciente introducción no son ya posibles. Los virus B y C parecen ser supervivientes ancestrales de un virus gripal surgido de las aves hace miles de años. Por estas razones los genes de los virus gripales pueden tener “edades” distintas que expliquen las distintas posibilidades de combinación entre ellos, y lo que es más importante, su éxito para establecer un nuevo linaje en humanos.

Los subtipos nuevos (variantes mayores) que aparecen en las pandemias de gripe sufren sucesivas variaciones menores y tienden a imponerse y sustituir al subtipo precedente. Así la aparición de la cepa A H2N2 responsable de la Gripe Asiática sustituyó a las variantes menores derivadas de la A H1N1 causantes de la Gripe Española y del mismo modo las cepas A H3N2 de la Gripe Hong Kong sustituyeron a las A H2N2 precedentes. La única excepción conocida ha sido la reemergencia en 1977 de virus del subtipo A/URSS/90/77 (H1N1) cuyas variantes menores cocirculan actualmente con las variantes menores A H3N2.

Desde 1977 es evidente que, en la presentación y difusión de nuevos subtipos de virus gripal A, puede intervenir un segundo mecanismo que supone la reaparición de un subtipo que circuló años atrás en la población humana. Este es el caso de las cepas H1N1 difundidas a partir de 1977 que son similares genética y antigénicamente a las que se aislaron en 1950 (A/FM/1/47). El mecanismo de esta reaparición, que puede representar una difusión pandémica, no se conoce. Una hipótesis apunta a la supervivencia en un reservorio animal, sin ningún proceso recombinante o con varias recombinaciones sucesivas que en todo caso respetaran las glicoproteínas de superficie de la cepa original otras hipótesis sugieren la reemergencia a partir de algún laboratorio.

Transmisión y difusión de los virus gripales

La gripe tiene una transmisión preferentemente interhumana ya que existe un cierto grado de restricción de huésped. Las infecciones por virus gripal A de los mamíferos y aves no se transmiten habitualmente al hombre. La única fuente de infección es el hombre enfermo o los casos asintomáticos. La transmisión ocurre siempre por mecanismo aéreo directo, como resulta obligado por la fragilidad del virus en el medio externo. Los fenómenos de agregación, mas frecuentes en los meses fríos y en las instituciones cerradas,

favorecen la difusión de los virus gripales, cuya transmisibilidad por microaerosoles es una de las más importantes entre todas las infecciones humanas. En el brote de gripe aviar de Hong Kong la transmisión a humanos se realizó por mecanismo orofecal más que por aerosoles y vía respiratoria, esta posibilidad ilustra la importancia del mecanismo de transmisión en los virus gripales. Es probable que los virus que tienen una transmisión preferentemente fecal no resistan o no alcancen dosis infectantes en la aerosolización del virus contribuyendo a mantener las infecciones restringidas a su huésped original.

La gripe se presenta habitualmente todos los años y durante los meses fríos en forma de brotes epidémicos más o menos importantes, como consecuencia de las variaciones menores de los subtipos de virus A y en menor frecuencia de variantes menores B. Toda la población es susceptible; la única limitación se debe a la existencia de inmunidad por contactos previos con virus idénticos o antigénicamente próximos. Las epidemias progresan en la población desde los niños a través de los grupos familiares y en las instituciones cerradas (guarderías, colegios, residencias de ancianos, cuarteles, etc.) y pueden afectar a una proporción significativa de personas y contribuir a una amplificación considerable del brote epidémico. La razón por la cual las epidemias de gripe desaparecen tras un lapso de 5-8 semanas a pesar de existir todavía población susceptible continúa siendo un enigma sin una respuesta completamente plausible. En los países de clima templado los virus gripales se aíslan durante todo el año pudiendo existir más casos en la estación húmeda.

La gripe A puede ocasionar pandemias como consecuencia de la aparición o reemergencia de variantes mayores (nuevos subtipos antigénicos) frente a las que la población carece absolutamente de inmunidad. Es característico su presentación en varias ondas epidémicas, que pueden no ocurrir en los meses fríos, y difunden en pocos meses por todo el mundo.

Morbilidad y Mortalidad

La importancia de la gripe como problema de salud pública reside tanto en la elevada morbilidad que origina en las poblaciones como en la mortalidad que puede ocasionar, tanto de forma directa como por agravamiento de otras patologías de base, sobre todo las de naturaleza crónica cardiorespiratoria en los denominados grupos de riesgo. Por

último, la gripe origina importantes costes sanitarios (directos), sociales y productivos (indirectos) derivados del absentismo laboral y escolar que provoca. En general las epidemias graves de gripe trastornan el normal funcionamiento y discurrir de las familias y la sociedad y suponen una sobrecarga importante para el sistema sanitario.

La gripe es reconocida como un problema sanitario tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo. Algunos estudios afirman que durante un periodo epidémico ordinario, un 10 % de la población mundial puede verse afectada, cifra que nos sitúa en quinientos millones de personas enfermas anualmente por este proceso (**tabla 10**).

La morbilidad que ocasionan los virus gripales se puede conocer a partir de los sistemas de declaración semanal de enfermedades. Los datos de morbilidad por gripe adolecen de las limitaciones de los sistemas de información epidemiológica obligatorios. La declaración se hace a veces por exceso, ya que la sospecha clínica sin confirmación virológica es muy razonable en ambiente epidémico. Existe una gran tendencia a declarar como gripe cuadros que estarían mejor encuadrados como infección respiratoria aguda (IRA). Por otra parte, existe sin duda una infradeclaración, debida fundamentalmente a que muchos casos no llegan al médico y porque siempre existe un incumplimiento administrativo de la declaración más o menos importante.

La infección gripal puede afectar a cualquier grupo de edad, pero existe una reiterada evidencia de que las tasas de ataque pueden ser diferentes en los diversos grupos etarios según los virus causales y los brotes epidémicos; por ello se analiza la incidencia de la gripe en forma diferenciada en niños preescolares (hasta los 4 años), niños en edad escolar (5-14 años), adolescentes y adultos jóvenes (15-24 años), adultos (25 a 59 años) y personas de 60 o más años. Las tasas de ataque para la gripe A suelen ser más elevadas en el grupo de escolares que en los otros grupos; la actual gripe A/H1N1, por otra parte, afecta raramente a los nacidos con anterioridad a 1957. La gripe B tiene una tasa de ataque mayor en los niños preescolares y escolares y menor en los grupos de mayor edad. En conjunto, la afectación de los niños hasta los 14 años de edad puede alcanzar valores tres o cuatro veces superiores a los que registran los de 60 o más años, aunque la gripe en los niños es generalmente más benigna que en adultos y sobre todo que en los ancianos.

La gripe pandémica ha tenido una enorme repercusión sobre la mortalidad en la

población. En términos de vidas humanas, la gran pandemia de 1918-19 no tuvo precedentes ni afortunadamente ha vuelto a repetirse. En menor medida, las pandemias de 1957 y 1968 causaron gran impacto en la mortalidad, llegándose a registrar en los EEUU más de 30.000 fallecimientos en cada una de ellas (**tabla 11**).

En los brotes epidémicos anuales la mortalidad incide principalmente en personas mayores pero también se produce un incremento entre personas con diversos procesos crónicos como la diabetes y especialmente en los pacientes con procesos cardiovasculares o respiratorios por ello esas poblaciones están definidas como grupos de riesgo.

El estudio de la mortalidad atribuible a la gripe ha sido objeto de numerosos trabajos utilizando diversas metodologías. En EEUU, se ha estimado que entre 1967 y 1991 cada uno de los brotes epidémicos registrados fue responsable de más de 20.000 muertes y que el 90% de los fallecimientos atribuidos a gripe y neumonía se produjeron en personas de 65 ó más años de edad. En los Países Bajos durante el periodo 1967-89 se constató que cada año fallecieron más de dos mil personas a consecuencia de la gripe, aunque en una importante proporción de los casos no se registró la gripe como causa de la defunción. Un estudio realizado en Francia sobre la mortalidad por gripe entre la población ≥ 75 años durante el periodo 1980-90 ofreció resultados similares; las tasas de mortalidad registradas se situaban en un rango de 11 a 81 fallecidos/100.000 personas (máximo 482/10⁵) y se correlacionaban con la intensidad de la epidemia. Para estimar el impacto real se ha propuesto multiplicar por cuatro las cifras registradas de fallecimientos por gripe.

El concepto de “exceso de mortalidad” o “hipermortalidad”, introducido por Farr en 1847, es extremadamente útil en el análisis epidemiológico de la gripe. En el curso de las epidemias gripales se produce un exceso de mortalidad por la rúbrica gripe, por neumonía e incluso por otras rúbricas, incluida la mortalidad general por todas las causas. Los excesos de mortalidad por gripe y neumonía constituyen indicadores altamente específicos que informan sobre la actividad gripal en la población. Durante los últimos 20 años se han realizado numerosos estudios sobre el exceso de mortalidad asociado a la gripe, sobre todo en Gran Bretaña y EEUU; que han sido fundamentales para valorar el riesgo que supone la gripe en las edades avanzadas. En Inglaterra y Gales, por ejemplo, durante 1976 el 65% del exceso de mortalidad asociado a la gripe se concentró en personas mayores de 65 años;

algunos años después otro estudio elevó aquel porcentaje al 88%. Resultados del mismo tenor se obtuvieron en estudios realizados en EEUU. En España, una estimación sobre la temporada 1989-90; valoró el exceso de mortalidad en seis mil defunciones. Algunos autores han desarrollado modelos estadísticos complejos basados en métodos autorregresivos (ARIMA) que correlacionan el exceso de mortalidad por gripe y neumonía y la actividad gripal en la población.

Impacto sociosanitario

La gripe es una enfermedad que tiene también notables consecuencias para la actividad económica de los países. Esto obedece sobre todo, al importante absentismo laboral y escolar que produce, al que se unen los costes derivados de la asistencia a los enfermos (consultas médicas, tratamientos, ingresos hospitalarios, etc.). Todo ello puede llegar a alterar de forma notable la capacidad productiva y económica de una sociedad.

Diversos estudios han analizado el impacto económico de la gripe desde diferentes vertientes. Por ejemplo, la pandemia de gripe Hong Kong en 1968 supuso para los EEUU un coste de más de cuatro mil millones de dólares. La gripe en el Reino Unido durante un brote epidémico moderado en la temporada 1974-75, se estima que ocasionó más de cien millones de libras de pérdidas en la productividad nacional.

También se ha analizado la repercusión sobre la asistencia médica. En un estudio realizado en Francia, basado en una red de vigilancia nacional de médicos generales, durante el período 1984-1995 las consultas médicas de la población trabajadora relacionadas con la gripe constituyeron entre el 1,4% al 6,5% de todas las consultas. Las consultas pediátricas por gripe durante los períodos epidémicos pueden constituir más del 75% de todas ellas, con tasas de hospitalización entre los menores de 5 años, solo superadas por las personas mayores de 65 años. Las tasas de hospitalización de los adultos de alto riesgo se multiplican de 2 a 5 veces según los grupos de edad durante los brotes epidémicos, alcanzando un máximo de ochocientas hospitalizaciones nuevas por 100.000 personas de alto riesgo; estas hospitalizaciones adicionales provocan en EEUU un gasto superior a los trescientos millones de dólares en cada brote epidémico.

En EEUU contabilizando los costes sanitarios (directos) y los debidos a la pérdida de productividad (indirectos), se llegó a estimar, a finales de los años ochenta, un coste para

la gripe de doce mil millones de dólares.

Vigilancia Epidemiológica

La gripe es una enfermedad que reúne los requisitos necesarios para ser sometida a vigilancia epidemiológica de carácter nacional e internacional. Los fines principales son: conocer con prontitud las características epidemiológicas y clínicas de la actividad gripal en la población, y obtener aislamientos representativos de los virus circulantes para su análisis antigénico. Ambos objetivos sirven como mecanismo de alerta para la toma de decisiones y se encuadran dentro de los sistemas de vigilancia de la gripe. Dichos sistemas varían de unos países a otros en función de su organización sanitaria.

La vigilancia de la gripe 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 IRA y neumonía. Otro indicador de gran utilidad es el análisis de la mortalidad por gripe y neumonía. También pueden monitorizarse otros datos médicos tales como hospitalizaciones, número de consultas, consultas de urgencias y consumo de medicación antigripal. Los datos indirectos no médicos más útiles son los del absentismo laboral y escolar.

Una adecuada vigilancia exige la combinación de varios indicadores. Las características clínicas de la gripe y su similitud con otras infecciones respiratorias agudas, ocasionan ciertas dificultades para una correcta vigilancia y aconsejan la combinación de varias fuentes de información para la morbilidad que se complementen con datos etiológicos procedentes de laboratorios de virología específicamente implicados en la vigilancia de la gripe. 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. En otros, se atiende más a la información recogida por redes de médicos centinelas sobre los casos de gripe e IRA registrados en la población. La información facilitada por la red de vigilancia puede ser recogida y difundida por métodos convencionales o por vía telemática, con la indudable ventaja de la rapidez y una adecuada retroinformación a los servidores de la red. Sea cual sea el sistema de vigilancia establecido es necesario correlacionar los datos epidemiológicos con la adecuada

información sobre los virus causales circulantes en la población. La información obtenida con los diversos sistemas puede completarse con el control particularizado de algunas instituciones cerradas (residencias de ancianos, guarderías) y determinados grupos diana de población, como la militar y la laboral de ciertas empresas.

En la actualidad disponen de programas específicos de vigilancia de la gripe la mayoría de los países occidentales europeos; Alemania, Bélgica, España Francia, Gran Bretaña, Holanda o de ultramar; Australia, Japón y EEUU, y se promueve la comunicación entre las redes de los diversos países europeos y a escala mundial.

La gripe tiene evidentemente una importancia supranacional. Por ello ha merecido una especial atención por la OMS que estableció en 1954 un Programa Internacional de Vigilancia de la Gripe (PIVG) que más perfeccionado, continúa en la actualidad. Sus objetivos principales pueden resumirse en:

- Recogida y análisis de información epidemiológica.
- Diagnóstico etiológico de los casos con aislamiento y caracterización de los virus causales.
- Estudios seroepidemiológicos sobre inmunidad de la población frente a las diferentes variantes y subtipos.
- Apoyo a la investigación sobre los virus gripales humanos y animales, la enfermedad gripal y la vacunación antigripal.
- Recomendaciones sobre la composición de la vacuna.

En el curso del Programa Internacional de Vigilancia de la OMS, las cepas aisladas durante la temporada gripal se caracterizan antigénicamente por RIH y se comparan con las cepas de referencia precedentes. En este análisis de la HA se basa fundamentalmente la decisión sobre qué cepas incluir en la vacuna antigripal para la temporada siguiente. Actualmente se procede además a la comparación de las secuencias del fragmento HA1 de las diversas H para detectar las variaciones ocurridas respecto a las cepas precedentes del mismo subtipo.

En el PIVG participan 110 Centros colaboradores distribuidos en 82 países y cuatro Centros de Referencia e Investigación; existen dos centros para el hemisferio norte;

situados en el CDC de Atlanta en EEUU y en Londres, Inglaterra y dos para el hemisferio sur localizados en Melbourne, Australia y en Japón. Las informaciones se centralizan en la Unidad de Enfermedades Víricas de la OMS en su Sede de Ginebra y se difunden semanalmente a través del *WHO Weekly Epidemiological Record*, o por medios telemáticos en casos especiales urgentes. El programa permite conocer con rapidez las cepas circulantes, caracterizar las variantes aparecidas y disponer de una información muy amplia sobre la gripe a escala mundial (**tabla 12**).

GRIPE PANDEMICA

En los foros de expertos en gripe se comenta desde hace algunos años el "sospechoso silencio de la gripe pandémica". La población humana no conoce una difusión pandémica desde 1968. No existe ninguna indicación sobre cuándo aparecerá una nueva cepa A recombinante, pero tampoco existe ninguna razón plausible para que no aparezca. Parece lógico que la emergencia de una cepa potencialmente pandémica estará más próxima cuanto más tiempo transcurra. Este acontecimiento preocupa a las autoridades sanitarias nacionales e internacionales y hace necesario planificar las actuaciones para hacer frente a este escenario. Los aspectos más relevantes a considerar para la eventualidad de una nueva gripe pandémica son los relativos al lugar y momento de su aparición, a las características antigénicas del virus, a los problemas para disponer rápida y masivamente de una vacuna. Debido al trastorno laboral, social y económico que puede suponer una gripe pandémica es necesario elaborar un plan integral de actuación preventiva (**tabla 13**).

La mayoría de las cepas pandémicas han surgido en Asia, y más concretamente en el sur de China. En dicha región se dan tres circunstancias que favorecen la recombinación entre cepas animales y humanas. 1) El clima subtropical de la zona permite que se produzcan infecciones gripales animales y humanas durante todo el año; 2) Existen zonas húmedas con abundante población de aves migratorias y gran circulación de cepas aviarias y posible exposición humana, 3) Las prácticas pecuarias y agrícolas favorecen la convivencia de aves acuáticas y aves domésticas, y existen granjas con patos y cerdos que pueden proporcionar el vaso o coctelera genética (cerdo), para la recombinación de cepas humanas y aviarias. El episodio de gripe aviar H5N1 ocurrido en Hong Kong, entre mayo de 1997 y diciembre de 1998, con casos mortales entre humanos ilustra la posibilidad de que el

hombre pueda actuar como vaso de recombinación. En los últimos años se han descrito, tanto en China como en otros lugares, infecciones limitadas en cerdos, patos y humanos por cepas recombinantes aviares. Como sucedió en el brote de gripe aviar de 1997-98 afortunadamente ha faltado siempre la transmisión interhumana a partir del primer caso, abortándose así la posibilidad de otra pandemia.

En cuanto al momento de aparición, no existe previsión alguna. Desde 1173, año en el que existe una descripción convincente de una epidemia de gripe en Europa; se han comunicado en distintos textos más de treinta grandes epidemias gripales; en doce de las cuales se ha podido documentar la estación del año en la que aparecieron los primeros casos. En dichas series hay un ligero predominio de las pandemias que aparecieron en los meses de primavera/verano del hemisferio norte. Parece evidente que una nueva cepa pandémica no aparecerá necesariamente en invierno como ocurrió en el verano de 1968 (Gripe “Hong Kong”)

La composición de los antígenos superficiales que pueda presentar la nueva variante entra de lleno en el terreno de la especulación. Podría ser de nuevo una HA de las que han circulado previamente; los subtipos H1, H2 y H3 han demostrado ya su capacidad de infección y transmisión interhumana y deben considerarse como una primera opción con otros subtipos de NA. Su circulación previa a 1933, fecha del descubrimiento de los virus gripales, ha sido demostrada serológicamente y entre los tres subtipos de HA, la H2 es la más plausible ya que la reemergencia de H1N1 desde 1977 y la actual circulación de H3N2 hacen que para la H2 haya transcurrido un periodo superior a treinta años, suficiente para disminuir la inmunidad de grupo. También podría ser cualquiera de las hemaglutininas descritas en animales no mostradas hasta ahora por las cepas humanas (de H4 a H15) y excepcionalmente alguna aún no conocida. No obstante se han postulado algunos subtipos de HA candidatos; el H4 (focas) y el H7 (caballos y focas) han demostrado capacidad de salto interespecie durante años así como las hemaglutininas H10 (visones) y H13 (ballenas). Los últimos subtipos de HA de virus aviares que han originado casos en humanos han sido la H5 y la H9 aparecidas en 1997 y 1999 en Hong Kong. Un dato preocupante adicional es la reciente evidencia de que algunas hemaglutininas aviares (H5 y H7) presentan determinantes de virulencia, responsables de infección fatal en las aves domésticas, debido a cambios importantes en el sitio de escisión proteolítica de su HA.

En el caso de una gripe pandémica, será necesario disponer rápidamente, y en cantidades masivas, de una vacuna monovalente frente a la cepa causal. Esto plantea muchos problemas científicos y técnicos a resolver. Es preciso mejorar al máximo el sistema de vigilancia, detección precoz y alerta, sobre todo en China. Hay que desarrollar modificaciones en la preparación de las vacunas para acortar los plazos de fabricación y centuplicar la capacidad actual de producción lo que supone, modificar disposiciones administrativas y mejorar e incrementar el suministro de huevos embrionados. No es fácil incrementar en un corto espacio de tiempo la producción de huevos embrionados que los fabricantes de vacuna programan con meses de antelación. Una solución alternativa es lograr la producción sobre cultivos celulares o emplear una tecnología de ADN recombinante para la producción de la vacuna. Todos estos aspectos afectan muy particularmente a la mayoría de países que son deficitarios en la producción y dependen de la importación de vacuna de otros países.

Es necesario preparar un plan detallado de actuación (**tabla 14**) sobre aspectos como: vigilancia epidemiológica, fabricación de la vacuna, prioridades de vacunación, medidas preventivas adicionales (quimioprofilaxis, actuaciones en instituciones escolares y cerradas, servicios públicos etc.) y prioridades sanitarias a nivel nacional sin olvidar los aspectos informativos por los medios de comunicación de masas (prensa, radio y televisión). En septiembre de 1994 el *VIIth European Meeting on Influenza and its Prevention*, formuló unas recomendaciones dirigidas a las autoridades Sanitarias nacionales, a los fabricantes de vacuna y a la propia OMS, que incluía también prioridades sobre la investigación en este campo. La OMS hizo suya esa preocupación y diversos países como, Alemania, Bélgica, Canadá, EEUU, Francia y Gran Bretaña disponen ya de planes para afrontar una gripe pandémica.

Las predicciones sobre el lugar del origen de la pandemia (Asia), virus candidatos (H2, H9, H7) y momento de aparición (no necesariamente invierno) no son más que suposiciones razonadas basadas en sucesos pasados que pueden no repetirse. Por otra parte se debe tener en cuenta que el mundo en general y la sociedad en particular han experimentado cambios importantes en la estructura y *modus vivendi* de hace 30 u 80 años. La población mundial no ha cesado de crecer, la interrelación entre países es mucho mayor, las comunicaciones y transportes son más veloces y los medios de comunicación mucho

más eficaces e independientes; al mismo tiempo que la atención sanitaria ha mejorado. Por ello, una futura pandemia no tendría porque repetir esquemas pasados aunque las tasas de ataque e incidencia y algunos aspectos biológicos fueran parecidos a pandemias anteriores.

PREVENCION DE LA GRIPE VACUNA ANTIGRIPAL

La profilaxis de exposición de la gripe es poco eficaz. Como en todas las infecciones víricas de transmisión aérea directa resulta muy difícil evitar el contagio y la difusión de la infección. No obstante, dada la importancia del factor de agregación en estos procesos, las autoridades sanitarias pueden tomar algunas medidas sobre todo en las instituciones cerradas. La prevención de la gripe se basa fundamentalmente en la vacunación.

Tipos de vacunas

Existen dos aproximaciones teóricas para la vacunación antigripal: las vacunas de virus inactivados y las de virus atenuados (**tabla 15**). En el momento presente sólo las vacunas con virus inactivados están comercializadas en todo el mundo y se utilizan ampliamente. Las vacunas con virus atenuados se encuentran en fase experimental muy avanzada y suponen una interesante perspectiva para el futuro.

Las vacunas antigripales inactivadas disponibles se pueden clasificar en tres categorías en función de su composición antigénica y el sistema de preparación empleado. Las primeras desarrolladas fueron las vacunas con virus enteros (VVE) compuestas por suspensiones purificadas de viriones completos inactivados; años después se desarrollaron las vacunas con virus fraccionados (VVF) que fueron aprobadas por vez primera en 1968 en EEUU. Están preparadas con suspensiones purificadas de viriones fraccionados por la acción de variados detergentes; Tween80-éter y tri(*n*-butyl) fosfato en EEUU; Triton N101, CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) y Tween80-éter en Europa y desoxicolato sódico en Australia. Estas vacunas contienen la HA, la NA y parte de la NP y proteína M.

Por último, se han comercializado vacunas solo con antígenos de superficie llamadas vacunas de subunidades (VAS); son vacunas obtenidas por fraccionamiento y purificación diferencial zonal que contienen sólo los antígenos de superficie unidos por sus extremos lipófilos.

Aunque existen diferencias entre las dos últimas categorías, pueden asimilarse, y considerar de forma general vacunas enteras y vacunas fraccionadas. Ambos tipos de vacunas tienen una eficacia satisfactoria y probablemente similar en términos de respuesta. Desde 1968 numerosos estudios comparativos han demostrado que las vacunas fraccionadas son tan inmunógenas como las VVE y dan menos reacciones adversas, sobre todo en niños. Este último extremo, comprobado durante los ensayos clínicos en la campaña americana de gripe porcina de 1976, aconseja la utilización de las vacunas fraccionadas en los niños. Se ha sugerido que las vacunas enteras pueden ser más eficaces en la revacunación de los ancianos, hecho que requiere confirmación.

Composición de la vacuna

La OMS como consecuencia de las informaciones obtenidas a través de su Programa Internacional de Vigilancia de la Gripe publica anualmente sus recomendaciones sobre las tres cepas de virus que deben incluirse en la vacuna a emplear en la temporada gripal siguiente en el Hemisferio Norte, que pueden ser modificadas para la posterior temporada en el Hemisferio Sur.

Las recomendaciones formuladas tienen en cuenta, no solo las variantes menores detectadas durante la reciente actividad gripal, sino también su potencial capacidad de difusión epidémica. Debido a la influencia que tiene las células en las que se ha aislado la cepa sobre la antigenicidad de la HA, debe asegurarse que las cepas propuestas mantienen el fenotipo de mamífero original tras su pase por huevo, propiedad necesaria para la fabricación de la vacuna. Para cumplir dichos requisitos es necesario, además de definir las cepas vacunales de la temporada siguiente, obtener recombinantes de laboratorio que posean los antígenos de superficie y elevada capacidad de replicación en huevos embrionados. A este respecto la cepa A/PR/8/34 es la más empleada para producir recombinantes de alta multiplicidad en huevo.

La OMS publica las recomendaciones sobre la composición de la vacuna para el Hemisferio Norte en el último informe del mes de Febrero del WHO *Weekly Epidemiological Record*. En la **tabla 16** se indican las cepas recomendadas para su inclusión en la vacuna desde las temporadas de 1989 al 2001. Como se puede observar, el virus A (H3N2) es el que ha mostrado una mayor variabilidad, detectándose variantes

potencialmente epidémicas todos estos años, lo que ha obligado a cambiar la cepa vacunal cada año. Por el contrario, el virus A (H1N1) se ha mostrado más estable y la cepa vacunal ha sido la misma durante amplios periodos de tiempo; algo similar a lo ocurrido con el virus B. Las normas internacionales establecen que la vacuna debe contener al menos 15 µg de la HA de cada una de las cepas incluidas en ella para que induzca una adecuada respuesta protectora.

Indicaciones y estrategias generales de vacunación

Las características epidemiológicas de la gripe establecen dos escenarios de presentación posibles: los brotes epidémicos anuales y las pandemias; en los cuales la estrategia general de vacunación ha de ser diferente.

En la situación actual, los brotes epidémicos anuales coinciden con los meses fríos, y están ocasionados indistinta o simultáneamente, por los subtipos de virus A (H1N1 y H3N2) y por virus B solos o en combinación. En este escenario la estrategia de vacunación se propone con una vacuna trivalente inactivada aplicada anualmente, antes de la temporada gripal, a todas las personas con factores de riesgo si padecen la gripe.

Una situación diferente se produciría en el caso de detección de una nueva variante gripal A de potencial difusión pandémica frente a la cual la población humana careciera totalmente de inmunidad. En este caso, la estrategia adecuada comportaría una vacunación amplia, incluso masiva, de la población con una vacuna monovalente inactivada de la nueva cepa pandémica.

La vacuna antigripal no es una vacuna de aplicación sistemática aunque su uso anual se preconiza cada vez con mayor amplitud. Puede ser recomendada a cualquier persona mayor de seis meses con riesgo de complicaciones si padece la gripe, pero los programas de vacunación señalan una serie de grupos y personas en los que está especialmente indicada su administración. La vacunación gripal tiene además, unas indicaciones sociales generales que pueden ser de aplicación en epidemias de especial intensidad o para preservar el funcionamiento normal de determinados servicios públicos.

Las recomendaciones de vacunación gripal cambian de un país a otro y aunque existe cierta uniformidad hay peculiaridades que dependen de la organización de la sanidad

pública en cada país. Las indicaciones del ACIP (*Advisory Committee on Immunization Practices* de EEUU) establecen dos grandes grupos de personas a vacunar: 1. - Las que presentan un riesgo elevado de padecer complicaciones, y 2. - Las que pueden transmitir la gripe a personas de alto riesgo. (**tablas 17 y 18**). El informe considera también un tercer grupo que engloba grupos especiales de población. Aquí se incluyen las embarazadas que vayan a pasar su tercer trimestre de gestación coincidiendo con las fechas habituales de gripe, los individuos infectados por VIH y las personas que viajen a áreas con gripe.

Una de las modificaciones más llamativas del ACIP sobre el grupo de personas que presentan riesgo elevado de padecer complicaciones ha sido la recomendación de vacunarse para las personas mayores de 50 años en lugar de 65 años como se postula en casi todos los países europeos. Esta recomendación se ha basado en que al menos un tercio de ese grupo etario padece una o más de las condiciones clínicas de indicación prioritaria para vacunación gripal.

Los aspectos de los que depende la eficacia de la vacunación gripal son: la homología entre las cepas vacunales y las epidémicas, la edad y condición inmune de las personas que se vacunan y la tasa de cobertura vacunal, que en las instituciones cerradas produce un efecto protector de grupo.

Administración, contraindicaciones y eficacia

La vacunación se aconseja anualmente, varias semanas antes de la previsible difusión de virus gripales en la población ya que en adultos se requiere un mínimo de tres semanas para lograr la respuesta óptima. La administración es por vía intramuscular o subcutánea profunda en adultos y por vía intramuscular en niños. Para adultos se recomienda una sola dosis de 0,5 ml. En los niños de 6 meses a 8 años que reciban por primera vez la vacuna se recomiendan 2 dosis separadas por un intervalo de 4 semanas. Las dosis en niños de 6 a 35 meses deben ser de 0,25ml.

Las contraindicaciones de la vacuna antigripal son: las de aplicación general para cualquier vacuna y la hipersensibilidad a las proteínas del huevo. Dada la posibilidad de una reacción febril tras la vacunación deberá considerarse el riesgo potencial de su administración a niños con historial de convulsiones febriles. La aparición de síndrome de Guillain-Barré es la única complicación grave tras la administración de la vacuna

antigripal. En 1976, en los EEUU durante el programa nacional de inmunización frente a gripe porcina, con una vacuna monovalente A/ New Jersey/ 76 (Hsw1N1), se observó un exceso de casos de Guillain-Barré entre los 45 millones de vacunados en comparación con la población no vacunada, estimándose el riesgo en 1 por 100.000 vacunaciones. Sin embargo los estudios posteriores sobre vacunas actuales con cepas sin hemaglutinina porcina no han demostrado asociación con dicho síndrome.

Se han notificado resultados falsos positivos en la serología de VIH, HTLV-1 y VHC tras la vacunación antigripal. Esta respuesta ocurre raramente y es de muy corta duración. Se cree debida a producción inespecífica de Ig M tras la vacunación.

La respuesta protectora tras la vacunación antigripal es del 70-90% de los vacunados. Entre los factores individuales que influyen en la eficacia de la respuesta inmunitaria, cabe señalar la edad, la patología crónica subyacente y exposiciones gripales anteriores. Los factores relacionados con la vacuna utilizada son la dosis y el tipo virus. Se consideran protegidas las personas con un título mayor o igual a 1/40 de Ac por RIH, aunque en ancianos el título protector alcanzado debe ser mayor.

En las personas mayores de 60 años, la efectividad se demuestra por la disminución de gripe clínica (50%). Con la revacunación anual el riesgo de sufrir la gripe se reduce de forma significativa. También se reduce más la mortalidad entre los sujetos con vacunaciones previas que en los vacunados por primera vez.. En los grupos de especial riesgo la vacunación reduce también la hospitalización ,las complicaciones y especialmente la neumonía y mortalidad asociada

La vacunación de adultos tiene asimismo una considerable efectividad y demuestra para los vacunados una disminución del padecimiento de enfermedad respiratoria de vías altas (25%), del absentismo laboral (43%) y del número de consultas médicas (44%) ocasionadas por esta patología.

El nivel de utilización de la vacuna antigripal varía de unos países a otros. En España el número de dosis dispensadas pasó de dos millones en la temporada 1984-85 a casi siete millones en la temporada 1992-93. En relación con otros países, incluidos los americanos, España ocupa actualmente una de las primeras tasas mundiales de vacunación con alrededor de 175 dosis de vacuna por 1000 habitantes.

Perspectivas de la vacuna antigripal

Actualmente se desarrolla una amplia investigación basada en diversas aproximaciones teóricas, que persigue la obtención de vacunas antigripales más eficaces, que confieran protección más prolongada y de más fácil fabricación y administración.

Resulta necesario conseguir una línea celular, preferentemente de origen humano, que proporcione un crecimiento vírico abundante. Ello supondrá un sistema fácil, barato y rápido para obtener la suspensión de virus que permita sustituir los huevos embrionados, garantizando la conservación de los fenotipos antigénicos humanos y evitando la presencia de proteínas del huevo, contraindicación principal de la vacuna actual.

La perspectiva más prometedora y desarrollada es la vacuna con virus atenuados. Existen varias razones para pensar que los virus atenuados pueden mejorar los resultados obtenidos con virus inactivados: 1) Es bien conocida su mejor eficacia en muchas otras infecciones víricas; 2) Su administración provoca una infección inaparente o subclínica que estimula una inmunidad semejante a la natural; 3) Administrada por vía mucosa induce una inmunidad local con Ig secretorias, esencial en las infecciones respiratorias y en concreto en la gripe, y también una inmunidad sistémica, y 4) La dosis necesaria puede ser pequeña y su administración muy cómoda.

Existen varias cepas atenuadas obtenidas por diversos métodos; las más utilizadas son cepas denominadas *ca* ("*cold adapted*"). Estas cepas adaptadas a replicar a temperaturas de 25°C, mediante selección por pases en el laboratorio, no lo hacen a temperaturas de 37°-38°C y por inoculación intranasal producen una infección nasofaríngea localizada. Evidentemente, no es posible realizar el método de atenuación con cada variante de virus gripal, por lo que se elaboran cepas recombinantes con las nuevas variantes que aportan la HA y NA, y cepas "donadoras" *ca* que aportan la adaptación al frío y el crecimiento restringido codificado por los seis segmentos genómicos restantes de la cepa

La vacuna atenuada más ensayada en la actualidad utiliza como cepa donadora un virus *ca* A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) desarrollado por Maassab. Esta cepa presenta un fenotipo *ts* (temperatura sensible) con replicación disminuida a 38-39° C, un fenotipo *ca* con replicación eficiente a 25° C y un fenotipo *at* (atenuado) con multiplicación restringida en tracto respiratorio. Se conocen con precisión las bases genéticas de esta atenuación que

depende de los segmentos genómicos PA y PB2 para el fenotipo *ca* y de PB2 y PB1 para *ts* respectivamente, mientras que la multiplicación restringida está codificada por los segmentos PB1, PB2, PA y M. (efecto de constelación de genes).

La vacuna atenuada se ha ensayado ya, mediante instilación nasal, en todos los grupos poblacionales (niños, jóvenes, adultos y ancianos) con resultados muy satisfactorios y se han hecho ensayos clínicos de gran amplitud en los EEUU que han dado lugar a un amplio debate científico como alternativa para extender la vacunación a grupos más grandes de población y sobre todo a niños y escolares al no precisar de inyección.

Otras aproximaciones científicas y tecnológicas de nuevas preparaciones vacunales se encuentran aún en el terreno puramente experimental. Es el caso de las vacunas con proteína M2, con péptidos sintéticos (de HA o de NP), con péptidos obtenidos por ingeniería genética y expresados en diverso vectores, y vacunas que utilizan una combinación de ambos enfoques. Así mismo la utilización de diversos adyuvantes y la presentación liposomal para mejorar la inmunogenicidad es otra línea a tener en cuenta.

Hace pocos años se ha propuesto una nueva estrategia general de inmunización consistente en la inoculación directa de ADN que codifica los antígenos protectores de diversos microorganismos. Se ha experimentado la inmunización contra la HA de la gripe A mediante la inyección de ADNc insertado en un plásmido. Los resultados logrados hasta ahora demuestran una respuesta inmune protectora muy satisfactoria, que puede obtenerse también por inoculación de un vector ADN que exprese el gen de la NP. La amplitud de la respuesta (tipo específica) supone una ventaja considerable. Sin embargo, la tecnología de las vacunas ADN está aún lejos de ser operativa; existen numerosos interrogantes sobre los efectos en el huésped y sobre la seguridad de una vacuna de este tipo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Builough PA, Hughson FM, Skehel JI, Wiley DC. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*. 1994, 371:37-41.
- 2) Claas EC, Kawaoka Y, De Jong JC, Masurel N, Webster RG. Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. *Virology*. 1985, 204:453-457.

- 3) Claas EC, Osterhaus AD, Van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA et al
Human influenza A (H5N1) virus related to a highly pathogenic avian influenza virus.
Lancet 1998. 351: 472-477.
- 4) Claas EC, Osterhaus AD.
New clues to the emergence of flu pandemics. *Nature Medicine* 1998, 4:1122-1123.
- 5) De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD.
Influenza virus: a master of metamorphosis. *J of Infect.* 2000, 40:218-228.
- 6) Goto H, Kawaoka Y.
A novel mechanism for acquisition of virulence by a human influenza virus. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2000, 95:10224-10228.
- 7) McIntosh K, Lieu T.
Is it time to give influenza vaccine to healthy infants?. *N Engl J Med.* 2000, 342:275-276
- 8) Nichol KL, Margolis KL, Wuorenma J, Von Sternberg T.
The efficacy and cost effectiveness of vaccination against influenza among elderly persons living in the community. *N Engl J Med* 1994, 331:778-784.
- 9) Nichol KL, Lind A, Margolis KL, Murdoch L, McFadden R, Hauge M et al.
The effectiveness of vaccination against influenza in healthy working adults. *N Engl J Med* 1995, 333:389-393.
- 10) Nicholson KG, Webster RG and Hay AJ eds. Textbook of Influenza.1998. Blackwell Science Ltd.London UK
- 11) Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Betebroer TM, Fouchier RA.
Influenza B virus in seals. *Science.* 2000, 288:1051-1053.
- 12) Rodríguez-Torres A, Castrodeza J, Ortiz de Lejarazu R
Vacuna antigripal. En Salleras San Martí LI, eds. Vacunaciones preventivas. Principios y aplicaciones. Barcelona, Ediciones Masson. 1998: 229-257
- 13) Rott R, Klenk HD, Nagai Y, Tashiro M.
Influenza viruses, cell enzymes and pathogenicity. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995, 152:516-519
- 14) Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lin W, Hall H et al.
Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998. 279:393-396.
- 15) Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG.

Initial genetic characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus. *Science* 1997, 275:1793-1796

- 16) The MIST (Management of Influenza in the Southern Hemisphere Trialists) Study Group. *Lancet* 1998;352: 1877-1881.
- 17) Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y.
Evolution and ecology of influenza viruses. *Microbiol Rev.* 1992, 56:152-179
- 18) Ziegler T and Cox N.
Influenza Viruses en Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FG and Tenover RH eds *Manual of Clinical Microbiology* 7th edition 1999 pp 928-935 American Society of Microbiology Washington DC. USA