INFLUENZA AVIAR DE ALTA PATOGENICIDAD

Dr. Elías F. Rodríguez Ferri (Universidad de León,
Academia de C. Veterinarias de Castilla y León
e Instituto de Estudios del Huevo)

INTRODUCCIÓN

Después del caso aislado de Álava en julio de **2006** (cuando se detectó por 1º vez un **H5N1** de alta patogenicidad (IAAP) en un somormujo lavanco encontrado muerto en el humedal de Salburua, en Vitoria, no tuvimos noticias de la enfermedad hasta **2013**, cuando se detectó un foco de baja patogenicidad (IABP) por **H7N1** en gallinas reproductoras en la provincia de Lérida. En este caso, aplicadas las medidas pertinentes (sacrificio y destrucción de todas las aves de la explotación, destrucción de materiales que pudieran vehicular virus y limpieza y desinfección), con establecimiento de las zonas de protección y vigilancia (clínica y de laboratorio) que marca la normativa, después de 3 meses sin focos secundarios, se recuperó el estatus de país libre.

El **3 de enero** de este año 2017 se recogieron en las cercanías de la laguna de la Nava de Fuentes, (Palencia) dos patos salvajes muertos, sobre los que se aplicó el protocolo de sospecha de influenza aviar, que fue confirmada **(H5N8)** por el Laboratorio Central Veterinario (LCV) el 12 de enero, procediéndose a la notificación a la OIE y a la aplicación de las medidas contempladas en la Directiva 2005/94/EC. El **21 de febrero** se confirmó un nuevo caso de IAAP por **H5N8** en una cigüeña muerta en Castelló d'Empúries, en el Parque Natural de Aiguamolls de l'Empordà, en Gerona. Los casos se comunicaron a la CE y a la OIE y se aplicaron las medidas correspondientes. El **23 de febrero de 2017** se notificó un nuevo foco de IAAP por **H5N8** en una explotación de patos de engorde en Sant Gregori (Gerona). Como la explotación había trasladado patos vivos a otras siete explotaciones de Cataluña, también resultaron positivas al virus. El **1 de marzo** se declararon afectadas otras dos explotaciones de patos sitas en el radio de 3 km del foco primario (en total 10 focos). Se aplicaron las medidas contempladas en la Directiva, incluyendo el sacrificio de todas las aves de la explotación (hasta 24.000 patos en total) y el establecimiento de las respectivas zonas de protección (3 km) y de vigilancia (10 km). Básicamente, 1) Censado de las explotaciones en 3 y 10 km; 2) Inspección clínica de las aves; 3) Evaluación de las medidas de bioseguridad aplicadas en las explotaciones; 4) Intensificación de la vigilancia en aves silvestres y 5) Difusión de la información sobre la situación epidemiológica (Manual de Operaciones, MAPAMA, set. 2014). Con fecha 20 de febrero se evacuó el primer informe de seguimiento del primer foco y el 3 de marzo se realizó un primer informe del segundo. Desde el **1º de abril** se retiraron las medidas restrictivas para movimientos nacionales e intracomunitarios y el **2 de junio** se recuperó el estatus de país libre de influenza de (IAAP).

EL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR

La influenza o peste aviar es un proceso infeccioso de las aves, muy contagioso y de mortalidad elevada, producida por un virus de la Familia *Orthomyxoviridae*, género *Influenza A*. Fue descrita por 1ª vez en Italia en **1878**, por E. Perroncito (aunque seguro que antes se habían producido ya en Europa otros brotes IAAP). Inicialmente fue confundida con una forma aguda y septicémica del cólera aviar, problema aclarado dos años después por Sebastiano Rivolta y Pietro Delprato, a la sazón directores del Instituto de Anatomía Patológica de Torino, el 1º, y de la Escuela de Veterinaria de Parma, el 2º, quienes demostraron su entidad clínica y

patológica independiente, denominando a la enfermedad *«Thyphus exudatious gallinarum»*. En **1901**, se determinó que estaba producida por un «virus filtrable» y en **1955** se estableció su naturaleza (virus influenza tipo A), después que en **1930** y **1933** se lograse aislar e identificar por 1ª vez, los virus de la influenza A porcina y humana. El término "influenza" procede de la creencia que estos procesos estaban causados por la "influencia" de los astros (Benedicto XIV -1675/1758-, *«influentia della stella»*), un tipo de causalidad a la que juntamente con motivos religiosos se acudía para explicar el origen de las enfermedades, sobre todo contagiosas. El interés de estos virus viene determinado por la producción de epidemias y pandemias en el ser humano. Los animales, particularmente aves y cerdos, suelen ser fuente de transmisión al hombre y participan en los fenómenos de variabilidad genética del genoma vírico.

Además del **interés sanitario,** por su condición de zoonosis (en ocasiones producen enfermedades graves, incluso mortales), la influenza aviar ha producido y lo sigue haciendo, costosísimas epidemias con consecuencias de todo tipo, sobre todo económicas que, al final, repercuten también en la salud y bienestar humanos. No obstante, debe hacerse constar que la mayoría de los virus de la influenza aviar (IA) solamente producen un proceso benigno (o ninguno) en las aves domésticas, considerándose de baja patogenicidad (IABP), aunque unos pocos, de alta patogenicidad (IAAP), pueden aparecer súbitamente o como resultado de la evolución de los primeros, con efectos devastadores y tasas de mortalidad que pueden llegar al 100%, además de las consecuencias comerciales.

Los virus influenza A (los únicos que afectan a aves y mamíferos y objeto de nuestro interés) son habitualmente pleomórficos, esféricos, alargados o filamentosos, provistos de envoltura, desde la que emergen varias proteínas superficiales, muy importantes en la biología vírica. El genoma está compuesto por 8 segmentos de ARNmc y sentido negativo (3'-5') con aproximadamente 14.000 nucleótidos. Su asignación numérica ha respetado la cronología de su descripción y así, el segmento 1 codifica para la PB2, el segmento 2 lo hace para PB1 (ambas polimerasas básicas), el 3 codifica para PA (polimerasa ácida), constituyendo en conjunto el complejo ARN polimerasa. El segmento 4 codifica para HA (hemaglutinina), el 5 para NP (nucleoproteína), el 6 para NA (neuraminidasa), el 7 para las M1 y M2 (proteínas de la matriz) y, finalmente, el 8 lo hace para las NS1 y NS2/NEP (proteínas no estructurales, aunque realmente solo lo es tal, la primera). El segmento 8 (NS) es el más pequeño de todos (alrededor de 890 nucleótidos). En estudios al M/E se ha descrito que cada segmento está envuelto por la nucleoproteína (NP) formando estructuras helicoidales.

En la **envoltura** asientan 3 tipos de proteínas; dos son **proyecciones o espículas de glicoproteína** (Gp) y la 3ª es solo una proteína integral. Las proteínas superficiales, en nº de 500, son en su mayor parte (80% de las de superficie, **25%** del total) **hemaglutinina** (HA), dispuesta en forma típica de bastón formando un trímero de proteína nativa (HA0) anclada a la envoltura por el extremo C-terminal (formado por aminoácidos –aa-hidrofóbicos), en tanto que el extremo N-terminal posee dominios para el sitio de unión (receptor) de ácido siálico en la membrana de la célula hospedadora. El resto de espículas, que adoptan forma típica de seta están organizadas por 4 unidades (un tetrámero) de **neuraminidasa (NA)** unidas por puentes SS y ancladas por el extremo N-terminal (también aa hidrofóbicos) a la envoltura del virus. Solo suponen un **5**% del total de proteínas del virus (en general, 1NA:4-5HA).

La **HA** se une al sitio receptor de ácido siálico en la célula hospedadora permitiendo la unión virus-célula y la infección, siendo por ello factor de virulencia principal. Además, es responsable de la fusión de la membrana del endosoma y de la liberación del ácido nucléico en el citoplasma. Es también antígeno (Ag) principal que genera respuesta de anticuerpos (Ac) protectores, y es diana de cambios debidos a mutaciones, que proporcionan variabilidad al virus.

La HA_0 se sintetiza en el retículo endoplásmico como un polipéptido sencillo, precursor, que se ensambla como un homotrímero, exportándose después a la superficie celular vía aparato de Golgi. Extracelularmente, en la superficie, post-traduccionalmente, HA_0 se escinde por proteasas específicas del hospedador, del tipo de la tripsina, como la triptasa Clara (una serin proteasa específica de arginina, producida por las células Clara que tapizan epitelio bronquial) en las subunidades HA_1 y HA_2, que se mantienen unidas por puentes SS. El trímero, forma la estructura cuaternaria de la proteína madura, y la trimerización solo es posible después que ha tenido lugar la escisión proteolítica del precursor HA0 que permite el plegamiento de las HA_1 y HA^2 maduras.

En la mayoría de las HA el sitio específico de escisión y la distribución restringida de las proteasas necesarias para ello, reducen la infección al tejido pulmonar (virus IABP). Sin embargo, en los subtipos H5 y H7, la existencia en el sitio de escisión de una secuencia de múltiples aa básicos (histidina, lisina o arginina –H, K ó R-), amplía la susceptibilidad a un rango amplio de proteasas celulares ubicuas del tipo de la furina y con ello el tropismo a otros órganos, incluido el cerebro, como sucede en casos de virus IAAP, aunque en tal situación juega también un papel fundamental el receptor celular. El papel de las proteasas en la escisión de la HA_0 es crítico para la infección celular y, consecuentemente, también lo es para el cultivo en el laboratorio[1]. Hasta la fecha se han descrito un total de 18 HA, que se diferencian antigénicamente.

La **NA** posee actividad enzimática de N-acetil neuramidil hidrolasa, capaz de romper los residuos de ácido siálico y la liberación del virus desde las células hospedadoras (enzima destructora del receptor) y de la mucina (previene de la agregación y permite la difusión del virus). También induce la producción de Ac protectores que impiden de la liberación vírica y bloquean la replicación. En virus H1N1 puede unir plasminógeno y activar la escisión de la hemaglutinina nativa (HA_0) comportándose como un factor responsable de incrementar la virulencia. Hasta la fecha se han descrito 11 NA, diferenciables antigénicamente.

La envoltura posee, además, algunas cantidades de una pequeña **proteína** integral denomina **M2** (un homotetrámero), que puede ser Gp, con función de canal iónico permitiendo reducir el pH del interior de la partícula viral, regulando la pérdida de cubierta y el ensamblaje del virión. También Induce Ac neutralizantes que reducen la replicación del virus y confieren protección de subtipo. Es diana de amantadina y rimantadina. La **matriz proteica**, por debajo de la envoltura, está formada por **proteína M1**, que da estabilidad al virión y juega un importante papel en la unión de la RNP. Es la proteína mayoritaria del virus (hasta el 37% del total) y es Gp.

En el **interior**, recubriendo los segmentos del genoma se encuentra la **Nucleoproteína (NP;** en realidad, **ribonucleoproteína, RNP)** unida a su vez a las **polimerasas** ARN, ARN-dependientes **(PA, PB1 y PB2)** formando un **complejo** que se relaciona con la capacidad de adaptación de los virus de la influenza (aviar) a células de mamíferos (incluyendo el hombre), como se puede comprender, un asunto de interés extremo. La NP es la 2ª en abundancia y permanece asociada con la estructura vertebral del ARN vírico.

Por último, se describen también dos **proteínas no estructurales (NS1 y NS2/NEP). NS2** (realmente ésta es estructural) está presente en cantidades pequeñas y parece que su función se relaciona con la exportación de las RNP del núcleo. **NS1** solo está presente en el núcleo de las células infectadas durante las fases tempranas de la infección o en el citoplasma en las fases tardías y se considera un marcador o determinante de virulencia (en H1N1) y de la susceptibilidad de hospedador, entre otros caracteres de interés.

[1]Los virus IA se replican eficientemente en embriones de pollo debido a la presencia de una proteasa en el líquido alantoideo que permite la escisión de la HA_0. En cultivos celulares, la replicación de muchas cepas requiere la adición de proteasas apropiadas (por lo general, tripsina), al medio de cultivo.

En los años que siguieron a su aislamiento e identificación, el **cultivo** en embrión de pollo fue el recurso habitual que todavía se mantiene hoy como sistema de elección cuando se precisa disponer de grandes cantidades de virus, por ejemplo, en la elaboración de vacunas, aunque en algunos subtipos se hace preciso una adaptación previa, habitualmente en cavidad alantoidea. En la actualidad se ha logrado adaptar los virus influenza A a crecer en cultivos de tejidos y celulares, principalmente de células renales, como las MDCK (células renales de perro Madin-Darby) o las células Vero. En cualquier caso, es habitual un tratamiento enzimático con tripsina, que escinde la HA_0 en sus subunidades activas.

Como en el caso de otros virus ARNmc y negativos, las fases del **ciclo biológico** para la producción de la progenie comprenden 5 etapas:

1) adsorción, entrada y pérdida de la cubierta; 2) síntesis de ARN mensajero (ARNm) y replicación del ARN vírico; 3) procesado post-transcripcional del ARNm y traducción para la producción de las proteínas víricas, produciéndose después, 5) el ensamblaje y liberación del virus.

En la **adsorción**, por parte del virus, interviene la HA que se une a un **receptor** adecuado de las células de un hospedador susceptible. Estos virus utilizan como receptores celulares glicanos que contienen ácido siálico (ácido n-acetil neuramínico) terminal, cuyos enlaces glicosídicos se relacionan con la HA vírica. En los virus humanos (por ej., H1, H2, H3) , las HA se unen a la galactosa del ácido siálico por enlaces glicosídicos α-2,6, mientras que los aviares prefieren ácidos siálicos conectados con la galactosa por puentes glicosídicos α-2,3.

La unión por enlaces α-2,6 del ácido siálico a la galactosa (que a su vez se une a la N-acetil glucosamina de la membrana celular), es frecuente de modo principal en células de la tráquea humana, mientras que los enlaces α-2,3 de unión del ácido siálico con la galactosa, son habituales en el epitelio intestinal de las aves, circunstancia que explica la preferencia de los diferentes subtipos virales por una especie particular, aunque tal preferencia puede ser superada en el caso de dosis altas de virus (sucede en infecciones por H5N1) o debido a unas pocas mutaciones puntuales en el gen de la HA que permiten la adaptación. Además, la distinción entre receptores aviares y humanos tampoco es absoluta pues algunos aislados aviares son específicos para α-2,6 o duales para α-2,6 y α-2,3 (por ej., el H9N2, el H7N9 o el sublinaje egipcio del H5N1). Por su parte, pollos o codornices, posee una mezcla de receptores α-2,3 y α-2,6 tanto a nivel de las células epiteliales del intestino como del epitelio respiratorio, lo que les convierte en buenos candidatos para actuar como intermediarios para los virus zoonósicos. En la evolución, los virus preferentemente humanos (H1, H2 y H3) no solo ganaron capacidad para unirse a α-2,6, sino que la perdieron para unirse a α-2,3 a consecuencia de una selección para el incremento de afinidad por los primeros. El sitio de unión del receptor se representa como una hoquedad donde se aloja el dominio globular del extremo distal de la HA_1, y la secuencia de aa en el receptor controla la especificidad de la unión.

Después de la unión con el receptor, el virus se internaliza en un endosoma (mediante clatrinas u otros) y se dirige hacia el núcleo celular. En el proceso cae el pH y se producen cambios conformacionales con la exposición del “péptido fusión”, una secuencia corta, hidrofóbica, localizada en el extremo N-terminal de la HA_2, que interactúa y fusiona la membrana del endosoma con la envoltura del virus permitiendo la liberación del ARN en el citoplasma. En la liberación interviene la M2 que forma canales iónicos en la envoltura-matriz vírica activando la bomba de protones del endosoma sobre el interior del virión ocasionando la bajada del pH y que se libere el ARN de la M1, permitiendo su salida al citoplasma. La acción de la M2 es completada con la de la RNP sobre la M1, que también debilita la estructura. Al final se produce la fusión y se libera el ARN en el citoplasma, siendo transportado al núcleo como un todo (los 8 segmentos de ARN). Además, durante la

entrada del virus, se inducen señales para facilitar la denominada vía endocítica que finalizará con la exposición de los Ags de origen vírico en el surco de la molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I, que se encargará de iniciar el proceso de inmunidad a cargo de los linfocitos T.

La **neuraminidasa** (NA) que es también una glicoproteína de la superficie del virus, posee actividad destructora del receptor, rompiendo la unión entre el ácido siálico terminal y el residuo adyacente de D-galactosa o de D-galactosamina. Se asume que su función se relaciona con la liberación de la progenie vírica desde las células infectadas, pudiendo controlar la morfogénesis vírica y su virulencia. La NA libera el virus influenza de los receptores trampa, como ocurre con el mucus respiratorio. Puede afirmarse así, que e**l equilibrio entre la actividad de la HA y la NA** posee un papel crítico en el la biología, tropismo y transmisión del virus influenza. Consiguientemente, los cambios que se suceden en el **receptor** pueden afectar a la susceptibilidad o contribuir a la difusión del virus.

El ciclo continúa con la **síntesis del ácido nucléico** (ARN) que tiene lugar en el núcleo de la célula hospedadora. Los segmentos genómicos siempre se presentan envueltos por la NP formando ribonucleoproteina (RNP) incapaz de difundir pasivamente a través de los poros de la membrana nuclear, por lo que están a expensas de los mecanismos celulares de transporte. En ese proceso, intervienen proteínas de la familia de las α-importinas que reconocen señales sobre la nucleoproteína e intervienen en su transporte al núcleo, donde el ARNmc del virus, de polaridad negativa (3'-5'), se utiliza como molde para la síntesis de dos clases de ARNmc de sentido positivo; por un lado, **ARNm** (mensajero) y copias completas de **ARNc +** (complementario) que serán utilizadas como molde para la síntesis del ARNv (del virus).

La **transcripción** de ARNm se inicia por el extremo que presenta capuchón (extremo 5'), que es escindido por un mecanismo denominado *cap-snatching* en el que se une la PB2 y escinde entre 10 y 15 nucleótidos (corriente abajo) a partir de un residuo de A ó G, los cuales sirven como un primer para iniciar la transcripción, aunque algunos sostienen que intervienen las tres PB. La síntesis de ARNm varía en función del momento de la infección. Después debe ser transportado después al citoplasma (ribosomas) donde es traducido en la síntesis proteica. Consecuentemente, la cantidad de proteínas sintetizadas depende de la cantidad de ARNm disponible, que se produce en dos fases. La 1ª transcripción de ARNm se produce inmediatamente después de la infección y los 8 ARNm se sintetizan en cantidades equimolares. Después, se produce una 2ª transcripción de ARNm, en una fase temprana y otra tardía. En la temprana se sintetiza preferentemente (se desconoce el motivo) ARNm que será traducido a NS1 y NP. En la fase tardía se sintetiza ARNm en cantidades equivalentes a las requeridas para el genoma de la progenie; en esta fase se sintetiza NS1 en un nivel reducido y de modo contrario, se expresan preferentemente HA, NA y M1.

HA y NA son después modificadas post-traduccionalmente para su integración en la membrana celular. La M1, que se asocia con la migración de la RNP para ensamblarse, contiene un dominio de localización nuclear que le permite entrar y salir del núcleo para regular el transporte de la RNP. Cuando se une a la RNP promueve su exportación al citoplasma. La NS2 también puede estar implicada en la translocación de la RNPv para el empaquetado en el citoplasma. Como en el extremo C-terminal de la NS2 existe un sitio de unión con la NS1, se ha sugerido que la NS2 puede regular y cooperar con la M1 asistiéndola en la exportación de la RNP.

Desde el punto de vista antigénico, aunque todas las proteínas estructurales son Ag de interés, las HA y NA son las más importantes (patogénesis, diagnóstico o diseño de vacunas); de hecho, los Ac frente a HA, NA y M2, son protectores. Además, las diferencias en HA y NA, sirven para la diferenciación y clasificación. La HA induce Ac específicos de subtipo, igual la NA. Finalmente, los Ac frente a M2, aunque protegen en el ratón, en las aves domésticas, la protección es mínima. La HA es el Ag principal. Cada uno de los monómeros $HA_1 + HA_2$,

está formado por una cabeza globular (que forma parte de la HA_1) y una región troncal (de la que forman parte ambas cadenas HA_1 y HA_2. En la cabeza está el dominio de unión al receptor (RBD, *receptor binding domain*) y un dominio vestigial de esterasa (VED, *vestigial esterase domain*), mientras que en el tronco se diferencian una hélice α principal enrollada en una región espiral que se encarga tanto del anclaje como de la fusión de la membrana celular (endosoma) una vez que se ha producido un cambio conformacional, debido a la disminución del pH.

En los últimos años, el desarrollo de herramientas bioinformáticas ha sido clave para el conocimiento de la estructura antigénica de estos virus (como en otros). El **mapeado antigénico** en el que se caracterizan los epitopes del virus, permite comprender los secretos de la variación antigénica y conocer las potencialidades epidémicas de una cepa de virus en particular. Hasta la fecha la mayor parte de los estudios se han centrado en la HA5. El 1º de ellos fue publicado en 1989 y se refería a un H5N9 aislado de pavos en Ontario en el que, sobre la base de conocimiento de la HA3 (influenza estacional en el hombre) los autores propusieron un agrupamiento de epítopes que inducían Ac neutralizantes en 5 regiones en función de la reactividad de Ac monoclonales frente a mutantes del virus. En el grupo 1, las mutaciones se producían en un lazo sobre la membrana de la cabeza globular distal (HA1 140-145), el grupo 2 con el HA1 156-157, el grupo 3 con HA1 129-133, el grupo 4 formaba parte de un barril β en el dominio VDE y el grupo 5 formaba parte de la estructura del lazo 130. Más recientemente, Wu *et al* (2008) realizaron una caracterización antigénica del H5N1 utilizando 17 Acm de ratón. En los últimos años se han realizado nuevos e importantes estudios para mapear la estructura del H5N1 que han permitido la identificación de casi 80 residuos que se asocian con la evasión inmune: Pese a todo, la caracterización del repertorio de epítopes está lejos de ser completa.

Variabilidad. Evolución.-En los virus influenza, evolución y adaptación están íntimamente unidas pues la 1ª permite la 2ª y ambas se basan en la inestabilidad genética que les hace especialmente **variables y en constante evolución**. En algunos, la variación es tan amplia que las regiones conservadas no llegan al 30% del genoma. La adaptación basada en la evolución adquiere un interés particular en el caso de los virus de origen aviar cuando se refieren al contagio humano. Los virus aviares se replican a 40-41ºC, la tª del tracto intestinal de las aves, siendo necesaria la adaptación para replicarse a la tª del tracto respiratorio de los mamíferos (en torno a los 33ºC). Se ha observado que cuando se producen sustituciones de algunos aa clave por mutación (por ej., E627K y D701N) la tasa de replicación se incrementa a esta tª, relacionándose con las necesarias asociaciones de diferentes proteínas, como polimerasa PB2 o NP. La variabilidad-inestabilidad de estos virus responde a razones como la **simplicidad**, la afinidad por **multihospedadores** y la naturaleza del **genoma** y las **proteínas** codificadas, ya referidas La naturaleza del genoma es crítica, favoreciendo la abundancia de mutaciones puntuales sin posibilidad de corrección (se multiplican en el citoplasma).

Los cambios responsables de la variación obedecen principalmente a 3 mecanismos evolutivos: 1) Cambios debidos a errores en la ARN polimerasa, 2) por reordenamiento genético y 3) por recombinación. Se configuran, así, la denominada **deriva antigénica** (*drift,* como consecuencia de cambios puntuales) y los **cambios antigénicos** (*shift,* como consecuencias de reordenamiento genético o mezcla de genes), principalmente. La **deriva antigénica** es consecuencia de la falta de sistemas correctores durante la replicación al producirse pequeños cambios genéticos, pero constantes, por **mutaciones puntuales, deleciones, sustituciones o inserciones**, que aprovechan la ventaja del cambio. En el complejo polimerasa de los virus influenza, por ejemplo, la tasa de mutación debido a errores de lectura es hasta 10 veces más alta que la se produce en virus ADN. En cada ciclo de replicación puede introducirse más de una mutación puntual por réplica y éstas pueden ser de efectos negativos, positivos o indiferentes, sobre la viabilidad.

El efecto más aparente de los cambios afecta a ambas HA y NA, originando variantes que no son reconocidas

ni neutralizadas por los Ac frente a la cepa parental, originando nuevas variedades antigénicas del virus que poseen carácter epidémico. Esas variantes dominan unos pocos años y después vuelven a ser reemplazadas por otras variantes nuevas. Aunque el fenómeno es más evidente en HA y NA, es obvio que el resto de genes también sufren estos cambios.

La **inserción de aa básicos múltiples e**n el sitio de escisión de la HA transforma los virus H5 ó H7 **IABP** en **IAAP** (en el brote de México de 1993 un IABP H5N2 cambió a IAAP a finales de 1994 y el estudio reveló que el virus había adquirido 2 aa básicos en el sitio de escisión de la HA; parecido ocurrió en Pensilvania en 1983 y en Italia en 2000. Cambios más abruptos en el genoma, pueden ser originados como consecuencia del **reordenamiento o la mezcla de genes**, un fenómeno que puede definirse como "*el reordenamiento de los segmentos genómicos del virus que tiene lugar cuando una célula es co-infectada con cepas de virus de diferente origen*". Sucede en una especie cuyas células posean receptores utilizables por virus de más de un origen, como sucede en el cerdo. En la progenie se observa un intercambio de segmentos genómicos que dan lugar a cepas con propiedades nuevas que, al infectar una población sin experiencia inmune previa y carente de protección, produce epidemias que puede pasar a pandemias. El reordenamiento solo se observa en los virus influenza A y se considera el origen de las cepas responsables de las pandemias de 1918, 1957, 1968 y 2009 en los que los virus pandémicos contenían genes de virus influenza del cerdo y/o de origen aviar. En las aves, el IAAP H5N1 de Hong Kong (1997) se debió a un reordenamiento del gen H5 de un virus del linaje H5N1 de Guangdong, con una NA de un H6N1, además de otros genes (PB2, M y PA) de un virus H9N2. El proceso implica, lógicamente, cambios antigénicos en las proteínas codificadas por los segmentos genómicos afectados. Finalmente, aunque es posible la **recombinación** del ARN (homóloga o heteróloga) no parece habitual, si bien algunos creen que puede que sea más frecuente de lo que se piensa, atribuyéndose a ella cambios de IABP en IAAP.

Reordenamiento y mutación puntual han resultado decisivos en la evolución de los virus de influenza, de forma particular en los tipos de alta patogenicidad, sobre todo en el caso del H5N1 que, como veremos, han originado una enorme diversidad de variedades y el proceso continúa.

Variantes. El resultado de la evolución. Mediante la intervención de uno o varios de los procedimientos descritos se han originado multitud de variantes. Las diferencias antigénicas a nivel de HA y NA, se utilizan en la división en **subtipos** que, a su vez, se utilizan en **nomenclatura**. Dentro del género Influenza A se refieren **tipos H** (HA), **tipos N** (NA) y **subtipos HN**, que son las combinaciones descritas hasta la fecha de las 18 variedades de HA y las 11 de NA. Con excepción de las dos últimas HA (H17 y H18) que se han descrito en murciélagos, todas las demás se han descrito en aves salvajes, principalmente acuáticas. Lo mismo sucede en relación con las NA, pues excepción hecha de las N10 y N11, descritas en los murciélagos, las demás se han descrito en aves salvajes. De entre las HA y NA, además de las aves (salvajes y domésticas), algunas se han descrito del hombre, el cerdo, perros, felinos y caballos, principalmente. Hasta la fecha, solo tres subtipos **(H1N1, H2N2 y H3N2)** han sido causa de **pandemias** en el hombre en el siglo XX, siendo por tanto los únicos que pueden establecer **linajes** en él. Sin embargo, la transmisión ocasional de virus de influenza aviar al hombre, como los **H5, H6, H7, H9 y H10**, puede dar originar procesos desde benignos a graves, aunque **sin transmisión estable interhumana**. El subtipo **H7N7** que ha circulado entre los caballos durante muchos años, es un ejemplo de un subtipo que ha establecido un linaje estable en este animal.

Más allá de tipos y subtipos H y N, hasta hace poco los autores establecían sus propios criterios para clasificar las cepas de virus influenza A, utilizando denominaciones y conceptos, en ocasiones muy arbitrarios y confusos. En la actualidad, el **Grupo de Trabajo de Nomenclatura** del tripartito (OMS-OIE-FAO), ha logrado un cierto órden aunque no total. Righetto et al. (2014) agrupan los tipos H en dos supergrupos y cuatro

grupos sobre criterios filogenéticos y serológicos. En el **grupo 1** se incluyen los H1, 2, 5, 6, 11, 13 y 16; en el **grupo 2**, se incluyen los H8, 9 y 12; en el **grupo 3** se incluyen los H3, 4 y 13 y en el **grupo 4**, se incluyen los H7, 10 y 15. Los dos supergrupos están formados por los grupos 1 y 2, y por los 3 y 4, respectivamente.

Los **genotipos** pueden definirse como variantes genéticas dentro de un subtipo. En el subtipo **H5N1**, desde su aparición en Guangdong se han descrito 12 genotipos como variantes genéticas de la cepa ancestral A/Gs/Gd1/1996 (H5N1) o genotipo GD. Después, los siguientes descritos fueron denominados con letras mayúsculas del alfabeto, desde la A a la E y por el final, pero en orden anárquico, desde la V a la Z: GD, A, B, C, D, E, X (X_0-X_3), V, Y, W, Z (Z^+) y G, en algunos casos, como se ve, incluyendo también subgenotipos (X_0, X1, X2, X3 y Z y Z^+). Es de interés que después de su emergencia en Guangdong y en un tiempo corto, los genotipos originales (GD, A, C, D, E) del linaje (Guangdong), desaparecieron y aparecieron después genotipos /subgenotipos nuevos (V, W, X1, X2, X3, Y, Z y Z^+) que emergieron por evolución.

Especialmente relevantes han sido los genotipos Z y G, los dos últimos descritos. La aparición del **genotipo Z**, descrito en cepas IAAP en los países del sudeste asiático, fue una consecuencia de deriva genética en el genoma del H5N1, por deleciones en los segmentos de la NA y NS. El **genotipo G**, por su parte, fue el resultado de un reordenamiento entre los genotipos W y Z. En Vietnam, por ejemplo, el genotipo Z dominó hasta 2006 (todas las cepas aisladas en este periodo, fueron linaje y sublinaje Guangdong, genotipo Z). En 2007-08 emergió el **genotipo G**, y desde 2010, han coexistido ambos (Z y G). En Vietnam se ha descrito el **subgenotipo N** (Norte) que predomina en el norte y **el S** (Sur), que lo hace en el Sur; en cualquier caso, las cepas circulantes eran una mezcla de sublinajes (Guangdong-like, Fujian-like y Qinghai-like).

Las nuevas herramientas de **secuenciación genética**, cada vez más rápidas y menos costosas han permitido aumentar de forma espectacular datos del virus aplicados a la caracterización (en 2013 ya superaban los 50.000 estudios de secuenciación total o parcial), a lo que se une la disponibilidad creciente de Ac monoclonales dirigidos frente a epitopes específicos que permiten estudios comparados desde el punto de vista filogenético, con aplicaciones en epidemiología molecular, identificación de procesos de reordenamiento de genes, de mutaciones y su relación con propiedades biológicas, etc., generando estrategias aplicables al diagnóstico, vigilancia, control y tratamiento. Debido a que el gen de la HA5 ha centrado la mayoría de las investigaciones, se ha observado una gran tendencia a la deriva antigénica generando cambios intragénicos muy complejos que producen variantes emergentes que han incrementado la capacidad de adaptación a numerosos hospedadores, permitiendo así que el subtipo H5N1 IAAP se haya distribuido prácticamente por todo el mundo. Solo entre 1996 y 2004, el H5N1 se diversificó generando nada menos que **10 clados distintos** (numerados de **0 a 9, en la actualidad ampliados con subclados hasta de 4º orden en los clados 1 y 2**) debido a la deriva mutacional en el gen de **H5**, todos los cuales tienen su origen en el primero formado en China (Goose/Guangdong/1996, identificado aquí como clado 0).

Los clados son definidos en la actualidad por el **Grupo de Trabajo de Evolución del H5N1**, de la **OMS/OIE/FAO**, cuando las cepas candidato reúnen los siguientes tres criterios: **1**) comparten un nodo común (que define el clado) en el árbol filogenético; **2**) forman un grupo monofilético con un valor de similaridad de partida >60% en el nodo que define el clado y **3**) promedio de divergencia de nucleótidos entre clados >1,5% y dentro del clado <1,5%.

Patotipos.- Como ya hemos referido, se habla de virus de influenza aviar IABP y virus IAAP. Los primeros producen enfermedad benigna o inaparente, mientras que los segundos producen enfermedad grave, aguda, incluso mortal, con una tasa de letalidad que en ocasiones llega al 100%. El criterio original, que aún se mantiene, se basa en la letalidad producida en pollos inoculados experimentalmente por vía endovenosa[2], aunque desde 1994 se incorporaron criterios moleculares como la presencia de múltiples aa básicos en el sitio de escisión de la HA_0. Los subtipos **H5 y H7**, que no son patógenos en las especies reservorio (con excepciones), se consideran los únicos **altamente patógenos (IAAP)** para las aves domésticas y además son causa de casos y brotes humanos (por contacto o exposición) bien conocidos desde finales de los años 90. La **OIE** considera objeto de notificación o declaración, a todos los virus IAAP e incluye también los H5 y H7, aunque sean IABP, que se justifica porque desde 2006 se pudo demostrar su **capacidad para evolucionar a IAAP**, circulando después entre las aves domésticas, como ya hemos recordado. La influenza de subtipos distintos de H5/H7 (es decir, de los subtipos H1–4, H6 y H8–16) **no se consideran "influenza aviar" y no son de declaración obligatoria**. Los virus de la influenza A IAAP en aves no de corral, incluidas las aves salvajes, son de declaración obligatoria. Aunque la determinación de la secuencia del punto de escisión se ha convertido en el **método de elección** para la evaluación de la patogenicidad de estos virus todavía se requiere la inoculación de aves para confirmar un resultado negativo, ya que no puede descartarse la posibilidad de que existan poblaciones de virus que contengan mezclas de IAAP y IABP. De hecho, se ha descrito que al menos dos cepas, ambas del subtipo **H10** (H10N4 y H10N5), habrían cumplido las definiciones *in vivo* de la OIE y la UE para los virus de IAAP, ya que mataron 7/10 y 8/10 pollos con valores del IPIV>1,2 cuando las aves se inocularon por vía intravenosa, pero no produjeron muertes ni signos de enfermedad cuando se inocularon por vía intranasal, y no presentaron una secuencia del sitio de escisión de la HA compatible con virus IAAP.

EPIDEMIOLOGÍA

Se incluyen más de cien especies de aves susceptibles en, al menos, 12 ordenes destacando *Anseriformes y Charadriiformes* que se consideran los reservorios primarios de estos virus. En ambos, la prevalencia de la infección puede ser muy alta, manteniendo el virus en el ambiente.

Anseriformes, sobre todo la familia *Anatidae*, que incluye especies de patos o ánades, ocas, cisnes, serretas, porrones, etc., son origen habitual, sobre todo el ánade real, ánade rabudo, cerceta de alas verdes y pato cuchara particularmente en otoño, durante sus migraciones al hemisferio Sur. Las *Charadriiformes* también acuáticas, pero no migratorias, como las gaviotas (Familia *Laridae*) y otras aves de marinas o de costa, son hospedadores naturales igual que los charranes o estérnidos (familia *Sternidae*) y otras muchas. Estas aves se concentran en grandes cantidades antes de iniciar sus migraciones o en ellas facilitando la transmisión del virus.

Aves **salvajes**. Se pueden aplicar estos considerandos generales [Yoon et al (2014)]: 1) En los reservorios, todos los subtipos (incluyendo H5 y H7) son IABP y causan enfermedad inaparente (reducción de la masa corporal y condición física) o ninguna.2) Los subtipos H5 y H7 de las aves salvajes, con capaces de difundirse a las domésticas, perpetuándose después de una generación a la siguiente durante su crianza. 3) En las aves salvajes se replican principalmente en el intestino y se difunden por vía fecal-oral a través del agua, aunque algunos subtipos (ej., H3 y H4) también replican bien en el tracto respiratorio. Los subtipos H5, H6, H7 y H9 han adquirido, en su difusión en las especies domésticas, capacidad de replicación preferente en el tracto

[2]Virus letal (10 días post-infección) para el 75% pollos de 4-8 semanas inoculados por via endovenosa o un IPIV de ≥1,2. En todos IABP H5 y H7, debe determinarse la secuencia de aa del sitio de escisión HA.

respiratorio, lo que facilita su difusión en las explotaciones con alta concentración de animales. 4)En sus reservorios naturales, los virus muestran una limitada evolución a nivel de aa, en el sentido de que están en equilibrio con ellos (un éstasis evolutivo y las continuas mutaciones no proporcionan ninguna ventaja), pero cuando se difunden a otros hospedadores (aves domésticas o mamíferos), se produce una evolución rápida con emergencia de variantes antigénicas y evolución de clados/subclados separados, como ha sucedido en los subtipos H5, H7 y H9 (WHO/OIE/FAO, 2014). 5) La transmisión interespecie (salto de la barrera de especie) se produce más frecuentemente entre las aves acuáticas salvajes y las domésticas; en este sentido, las condiciones para el intercambio en humedales y arrozales en Asia, se consideran óptimas. 6) El intercambio entre ambos tipos de aves acuáticas (salvajes y domésticas) y entre aves acuáticas y terrestres domésticas se produce en las granjas en las que se explotan conjuntamente igual que en los mercados de aves vivas, que proporcionan condiciones óptimas para la transmisión y la mezcla genética de virus. Estos mercados proporcionan también condiciones ideales para la transferencia de virus desde las aves domésticas a los mamíferos, incluyendo el hombre (en China en 2013, el cierre de los mercados redujo el número de casos humanos por H7N9 a casi cero a la vez que un incremento igualmente dramático cuando fueron reabiertos). 7) Todos los datos evidencian que la transmisión interespecie es un suceso relativamente frecuente, pero los subtipos que se estabilizan en los nuevos hospedadores, son escasos, especialmente en los mamíferos (mientras que varios subtipos transmitidos desde las aves salvajes a las domésticas terrestres han establecido linajes más o menos estables, solo los subtipos H1, H2 y H3, han sido capaces de establecer linajes estables en relación con los mamíferos, sobre todo en el hombre).

Aves **domésticas**.-Como la mayoría de los subtipos se han identificado en **patos salvajes**, también replican en los **patos domésticos** (solo los H14 y H15 aislados principalmente de gaviotas, habitualmente no replican en patos), en los que todos los subtipos (H1-H16, incluso H5 y H7) son IABP produciendo infecciones inaparentes, sin signos clínicos. Las **codornices** son la única especie de terrestres que permite la replicación de la mayoría de los subtipos, también de forma inaparente, por lo que se ha considerado un hospedador intermediario general, dado que posee receptores celulares tanto de tipo α-2,3 como α-2,6. No debe extrañar por ello que fueran prohibidas (con las aves acuáticas) en los mercados de aves vivas de Hong Kong, al considerarse que representa una "mezcladora" entre las aves acuáticas y las terrestres. Se consideran la fuente del **linaje G1 del H9N2**. Las **gallináceas** (pollos y gallinas, perdices, pavos o pintadas) representan el bloque de destino habitual de los contagios desde las aves salvajes (directa o indirectamente) a las domésticas explotadas para carne o huevos, igual que por otras razones (comercialización en circuitos industriales o en otros que implican mercados de aves vivas al aire libre). Los **pavos** poseen tanta importancia como las gallinas y pollos. Pese a todo, la mayoría de los subtipos han sido incapaces de establecer linajes permanentes en las gallináceas, siendo excepción los subtipos **H6N1 y H9N2**, que han establecido linajes estables en los pollos. Los **H5** y **H7**, son singulares pues pueden evolucionar a IAAP con hasta un 100% de mortalidad y, esporádicamente, difundirse al hombre con mortalidades de hasta el 60%.

Es habitual que los virus IABP sean transferidos desde las aves salvajes a las domésticas, en las que la falta de adaptación produce un desenlace fatal, aunque también puede ocurrir que se inicie un proceso de adaptación y el virus continúe circulando como IABP. Una vez que el virus se ha adaptado a las aves domésticas, es raro que regrese a las aves salvajes (aunque puede suceder). Tanto virus IAAP como IABP se han aislado de muchas aves domésticas, incluyendo gallináceas y aves de caza, patos, gansos, avestruces y otras aves corredoras, palomas y aves de jaula, aunque algunas especies parecen más resistentes que otras a la infección, como sucede con las palomas o las psitácidas, sobre todo cuando se comparan con gallinas o pollos.

Linajes aviares de virus influenza. Aunque las aves domésticas, como hemos indicado, pueden infectarse por muchos subtipos IABP y IAAP, 3 linajes poseen interés especial: el linaje asiático del H5N1 (incluyendo el H5N8), el euroasiático del H9N2 (IABP) y linaje del H7N9 (zoonósico).

El linaje asiático del **H5N1**, IAAP emergió en las aves domésticas en China en 1996 (A/Goose, Guangdong/1996) y desde allí se difundió (en aves y mamíferos) originando variantes por reordenamiento o mezcla con otros virus circulantes en Asia, dando origen a subtipos nuevos como el H5N2, el H5N5, el H5N6 o el H5N8. El H5N8 comenzó a difundirse desde 2014 en Asia, Europa y América del Norte mezclándose con linajes americanos de otros virus para producir variantes singulares. Los investigadores están de acuerdo en que las aves salvajes pueden transferir virus H5N1 o H5N8 IAAP a regiones geográficas nuevas. El linaje asiático del H5N1 IAAP parece tener un rango de hospedadores inusualmente amplio, pudiendo infectar a una amplia variedad de aves salvajes *Anseriformes y Charadriiformes*, como hemos visto, produciendo tanto infecciones asintomáticas, como clínicas.

El linaje euroasiático del **H9N2** (IABP) se ha detectado en muchas aves salvajes y domésticas y, al igual que el H5N1, se ha diversificado con numerosos reordenamientos, incluyendo algunos que comparten genes internos con el H5N1.

Por último, el H7N9 zoonósico IABP, que recientemente produjo brotes humanos en China, circula habitualmente en aves domésticas y en estos últimos años ha adquirido genes procedentes del H9N2 diversificándose a su vez en diferentes sublinajes. Se han descrito habitualmente en especies domésticas y en muestras ambientales de mercados o explotaciones. Ocasionalmente se han aislado de loros, aves acuáticas y palomas, siempre de forma asintomática. Experimentalmente infectan especies como la codorniz japonesa, patos (los patos de Pekin son resistentes), gansos, palomas, pinzones cebra y algunos más, pero solo pollos y codornices transmiten el virus eficientemente a otras aves y no se ha descrito la eliminación de titulos altos del virus en secreciones orofaringeas. El H7N7 IABP es muy semejante al H7N9 y se ha identificado en aves domésticas en China y potencialmente puede infectar mamíferos.

En los últimos años se han descrito (solo por PCR, sin cultivo ni otros datos) en los murciélagos los subtipos H17N10 y H18N11 que plantean la posibilidad adicional de nuevos reservorios.

El **cerdo,** al lado de humanos y caballos, es el hospedador mamífero mejor conocido susceptible a los virus influenza aviar. Susceptibles a un número limitado de subtipos de virus endémicos (H1N1, H3N2 y H1N2), se han propuesto como mezcladores para virus pandémicos (presencia de receptores α-2,3 y α-2,6 en el tracto respiratorio). La mayoría de estudios describen infecciones esporádicas y hasta ahora es dominante el subtipo H1N1 **del linaje** euroasiático. Virus de influenza porcina se han aislado de pavos y, esporádicamente, de aves salvajes, aunque el impacto sobre estas últimas parece menor. Ocasionalmente se ha descrito también el H9N2, incluso con signos clínicos.

Los virus de la **influenza equina** incluyen, principalmente, los subtipos H7N7 y H3N8. El 1º se aisló de un brote de influenza en Checoslovaquia en 1956 (ahora extinguido) y el 2º en un brote de influenza en Florida. Mediante genómica se ha sugerido su posible origen aviar. En 2000, el H3N8, cruzó la barrera de especie y se asoció con procesos respiratorios **en perros** que se consideraban resistentes. Se han descrito **dos linajes**, uno de origen aviar, el **H3N2** (que ha sido denunciado en China y Corea del Sur) y el antes citado **H3N8**, de origen equino. Importante es que en 2004, se demostró también la infección (serología y aislamiento), del **H5N1** en Tailandia, refiriendo su participación en la posible adaptación de este subtipo a los mamíferos. Finalmente, hace tiempo que se viene sugiriendo la posibilidad de que gatos clínicamente sanos pudieran estar infectados

con virus influenza, primero con el H3N2 y después con otros subtipos (H2N2 y H3N2 de origen humano, H7N7 aislado en las focas, o H7N3 de origen aviar. En la epidemia asiática por H5N1, estos virus se describieron 1º en **gatos**, con mortalidad, y después en leopardos y tigres, que antes se consideraban resistentes. Todavía más, en programas de vigilancia, se ha descrito la infección con el H9N2 en gatos y perros (como es conocido, éste es endémico en aves en Asia y Europa, con transmisiones esporádicas al hombre). Así, en gatos y grandes felinos se han descrito los subtipos **H2N2, H3N2, H5N1, H5N2, H7N3, H7N7 y H9N2**.

El fenómeno de la adaptación.-Cuando se produce la transmisión de los virus influenza desde las aves salvajes a las domésticas e incluso a los mamíferos (desde las aves salvajes o las domésticas), la falta de adaptación hace que se repliquen mal y se transmiten peor entre ellos, siendo habitualmente causa finalista de muerte, muchas veces con un periodo clínico muy corto (o sin él). En algunos casos se inicia entonces lentamente una adaptación que va acompañada de disminución de virulencia y mortalidad. Al final, la adaptación incrementa la capacidad del virus para replicarse en el nuevo hospedador y para transmitirse eficientemente intraespecie. Desde los reservorios salvajes y debido a la variabilidad, algunos virus influenza se adaptan y mantienen en aves domésticas, incrementando su capacidad para replicarse y transmitirse entre ellas. En los últimos años, desde los IABP, debido al incremento del sistema de explotación intensiva con bajos niveles de bioseguridad, el aumento del comercio (incluso clandestino) y los mercados de aves vivas, ha incrementado las oportunidades de transmisión con más posibilidades para que los virus se adapten y muten a las formas de alta patogenicidad (IAAP). Una forma de evaluar la **adaptación de un virus** a una especie consiste en determinar experimentalmente la **dosis infecciosa mínima 50%** (DIM_{50}). Utilizando experimentalmente pollos administrados en mucosas se ha demostrado que virus IABP procedentes de aves salvajes presentan DIM_{50} (log 10) altas (desde 4,4 a >7,5), mientras que virus IABP de aves domésticas tenían valores más bajos (2,8 a 6,9) y los IAAP muy bajos (1,2 a 4,7). En cualquier caso, parece claro que la **introducción, transmisión y adaptación** de un virus influenza de aves salvajes a las domésticas es **una cadena compleja de eventos, con fases por el momento mal conocidas e influencias múltiples, incluyendo la susceptibilidad natural.**

Una forma alternativa **de evaluar la adaptación** consiste en **estudiar la cantidad de virus que se eliminan (por vía orofaríngea y cloacal)** después de la infección experimental; la idea es **que los virus bien adaptados replican mejor y se eliminan en cantidades mayores** que los virus escasamente adaptados; no obstante también influyen factores como la edad, la dosis y la vía de desafío o la raza del ave.

Como quiera que sea, el proceso de adaptación a un nuevo hospedador es **impredecible**, con **pocos marcadores genéticos** disponibles. Se han descrito **diferencias en aa** aunque es difícil las importantes. **Los cambios más claros, se producen en la HA y en la NA**. En la **HA,** ya nos hemos referido a la adición de aa básicos, lisina y arginina, en el sitio de escisión de la HA de los subtipos H5 y H7 **se traduce en el fenotipo IAAP** (Suarez, 2008). **En relación con la NA**, la adaptación se relaciona con la presencia de **deleciones en la secuencia troncal** (*stalk región*) formada por alrededor de 30 aa hidrofilicos, siendo la zona intermedia entre la región transmembrana y la cabeza globular, la que contiene el sitio enzimático de la proteína. La secuencia de esta zona es extremadamente variable entre los subtipos, y su función consiste en extender el sitio enzimáticamente activo de la proteína lejos de la superficie celular o viral. La NA separa el ácido siálico del virus (como de las proteínas del hospedador) y es importante en la liberación del virus desde la célula infectada. En las aves salvajes, la longitud de la secuencia troncal (dentro de un subtipo dado), esta altamente conservada, pero cuando los virus se replican en las aves domésticas, se producen deleciones (normalmente se delecionan 12-20 aa) reduciéndose la actividad enzimática haciendo que el virus pierda adherencia.

En las **proteínas internas (PB y NS)** no se ha descrito ningún patrón para determinar si el virus está adaptado a las aves salvajes o a las domésticas. La presencia de lisina (o ác. glutámico) en la posición 627 de la PB2, parece correlacionar con virus que están adaptados a mamíferos, permitiendo replicar a tªs más bajas compatibles con las del tracto respiratorio en mamíferos, aunque H5N1 de linaje asiático (con lisina en esta posición), se ha aislado de muchas especies.

Transmisión.-Los virus de la influenza aviar se eliminan a través de las heces y las secreciones respiratorias (orofaríngeas) pero la cantidad depende de muchos factores como la cepa, el hospedador y factores ambientales. Las heces contienen grandes cantidades de virus en los reservorios naturales y en ellos, la vía de transmisión predominante es fecal-oral, sin descartar la fecal-cloacal, no siendo relevante la transmisión respiratoria aunque existen excepciones; virus adaptados a las gallináceas domésticas, como el linaje asiático del H5N1 IAAP, pueden encontrarse en cantidades altas tanto en las heces como –especialmente- en las secreciones respiratorias, incluso en el caso de aves salvajes acuáticas). Pueden considerarse virus resistentes, pudiendo sobrevivir 35 días a 4ºC en heces (dependiendo de diversos factores como la cantidad, la tª y humedad, etc.). Persisten mejor en agua fría y dulce, que en agua salada (algunos han descrito supervivencias de hasta 1 año-) aunque la microbiota del agua puede reducir la supervivencia, especialmente a tª altas, en las que solamente se mantienen unos días. En heces se ha demostrado supervivencias de 44-105 días. En la desinfección son activos muchos productos como el hipoclorito sódico, el etanol (60-95%), los derivados de amonio cuaternario, aldehídos, fenoles, ácidos, povidona yodada y otros muchos agentes. El calor le inactiva a 56-60ºC en 1 hora o las radiaciones ionizantes o los valores extremos de pH (1-3 ó 10-14).

Desde el reservorio salvaje a las aves domésticas se cree que el virus pasa por la ruta fecal oral mediante el agua, el alimento, el ambiente o las instalaciones contaminadas. El contacto directo de las aves domésticas con aves salvajes es el procedimiento habitual bien documentado en casos de exposición de pavos domésticos con patos salvajes, en periodos de migración de éstos, coincidiendo la crianza de los primeros al aire libre (por ej., en Minnesota). La transmisión **a través del agua de bebida contaminada** posiblemente a partir de patos salvajes se ha relacionado con algunos brotes en Canadá, USA, Chile o Australia. Los patos infectados pueden eliminar hasta $10^{7,8}$ EID g^{-1} de virus en sus heces, más que suficiente para contaminar el agua.

Transmisión intraespecífica.- En las aves domésticas de explotación industrial, la contaminación del agua de abastecimiento es muy importante, pudiendo ocurrir a partir de restos fecales de aves infectadas o de polvo contaminado con heces. Los **fómites** (equipo, superficies, calzado y vestidos contaminados con polvo, heces, secreciones y plumas contaminadas) pueden ser claramente fuentes de contagio en las que el virus puede sobrevivir hasta 3 semanas. También se ha considerado que los insectos pueden ser importantes vectores mecánicos. La transmisión es posible vía aerosoles o por gotitas, así como por la dispersión debida al viento de fómites. Entre granjas o entre diferentes regiones, el procedimiento más común es por el comercio de aves, sobre todo clandestino (sin descartar otros).

Desde las aves al hombre.- Como se puede imaginar, es una cuestión del máximo interés. Los virus de la influenza aviar se han detectado en la yema y albumina de los huevos de gallinas, pavos y codornices enfermas con virus IAAP. Aunque los huevos infectados es poco probable que eclosionen, los rotos podrían transmitir el virus a otros pollitos en la incubadora. En el caso de los virus IABP se considera una situación muy rara. Por otra parte, los virus IAAP se difunden sistémicamente, por lo que pueden estar presentes en músculos esqueléticos y en órganos, aunque el cocinado es suficiente para garantizar la inocuidad. No obstante, si no se dan estas condiciones, potencialmente el riesgo existe a través del consumo de carne fresca

o mal cocinada. En cualquier caso, como tanto pollos como pavos infectados por IAAP suelen morir rápido, el riesgo de comercialización de carne es inhabitual y en relación con los huevos, como es sabido se produce una caída drástica de la puesta, hasta la muerte.

Historia natural de la Influenza Aviar IAAP

Ya nos hemos referido a la primera descripción de Perroncito en Italia en 1878. Se podría añadir que en el caso del hombre, la influenza ha sido la causa de numerosas pandemias que, Taubenberger y Morens (2009) cuantifican en un total de 13, desde 1500 hasta 1978, prácticamente 500 años aunque, como se puede comprender, en algunos casos con información confusa, un aspecto que no debe extrañar si se considera que su naturaleza vírica no fue descrita hasta 1933[3]. Como señalan Alexander y Brown (2009) en los primeros años existió gran confusión entre la influenza y la enfermedad de Newcastle, descrita por Doyle en 1926 sobre la que algunos postulaban que se trataba del mismo proceso. En el clásico trabajo de Burnet y Ferry en 1934, además de lograr adaptar el embrión de pollo al cultivo del agente (identificado por Centanni y Savonuzzi como un virus filtrable en 1901), demostraron definitivamente la identidad de ambos procesos. En 1943, Lush demostró la hemaglutinación, que permitió detectar, identificar y medir la respuesta de Ac frente al virus. Hasta los años 50, todos los virus identificados (de alta virulencia) pertenecían al actual subtipo H7, aunque la confusión era la norma. En 1956 se identificaron por primera vez, a partir de patos, virus de baja virulencia, respectivamente en Checoslovaquia (un H4N6) e Inglaterra (un H11N6).

Los brotes por **IAAP**, han sido agrupados por Alexander y Brown (2009) en tres periodos; el 1º va desde la descripción original de Perroncito **hasta 1958**; entre **1959 y 1995, el 2º**, y desde **1996 hasta 2009, el 3º**. La base fundamental de los primeros datos ha sido recogida en la obra de Swayne (2008) referida a Europa, Asia y América en la que, según Kaleta y Rulke, parece que la epidemia descrita por Perroncito se prolongó hasta 1880 y después reapareció, en una larga serie de brotes entre 1895 y 1906 difundiéndose a otros países como Alemania, Austria, Francia, Bélgica, Dinamarca, Holanda, la República Cheka y Polonia y, probablemente también a Sudán y Egipto. Se apunta también a una 3ª epidemia en esta época entre 1919 y 1931 en la que también se afectaron países europeos, e incluso algunos sostienen que fue endémica en Italia hasta 1935 sufriendo sucesivas ondas epidémicas. En Inglaterra se diagnosticó por 1ª vez en 1922 y después en 1929. En EE.UU., los primeros brotes sucedieron entre 1924 (en Nueva York) y 1925 (en todo el Estado, además de New Jersey, Indiana, Pensilvania, Connecticut, Illinois, Virginia y Missouri), y nuevamente en 1929 (en este caso solo en Nueva Jersey). Se ha citado que fue responsable de los brotes un investigador que había importado un cultivo en 1923, también un H7. Entre 1930 y 1959 solo se registraron unos pocos brotes entre los que se incluyen uno en Italia, en 1935, aunque algunos autores (Wells, 1963) señalan que aquella época la enfermedad era endémica en Egipto y otros lugares de África, Asia y Europa del Este, pero los datos son muy confusos.
Entre **1959 a 1995** hay registradas 15 epidemias, 14 en aves domésticas (5 en pavos y 9 en pollos) y 1 en

[3]La gripe 'española' de 1918-19 es la más mortal de todas, con más de 50 millones de muertos, producida por un H1N1 de origen aviar, aunque la mortalidad se asoció con una neumonía de origen bacteriano. El virus responsable desapareció de la circulación cuando se produjo la pandemia 1957, producida por un descendiente del virus del 18 en el que se habían sustituido la HA y la NA (H2N2), además de una nueva PB1 de origen aviar, desconociéndose en que especie pudo producirse el reordenamiento de genes. La pandemia se inició en el sudeste asiático (gripe asiática) y luego se difundió por todo el mundo. La pandemia de 1968 se inició en Hong Kong, por un H3N2. Se difundió otra vez desde el sudeste asiático, fue de baja mortalidad y rápidamente se hizo endémico en el mundo.

golondrinas de mar (charranes). En 1959 se identificó por 1ª vez un H5N1 (hasta entonces H7 era el habitual). El subtipo H5 se describió tanto en aves domésticas (H5N9 en pavos, en Canadá, en 1966; H5N2, en pollos en Pensilvania, en 1983 y en México, en 1994; H5N8 en pavos, en Irlanda, en 1983 y H5N1 en pavos en Inglaterra, en 1991) como en salvajes (en charranes, en Sudáfrica, por H5N3 en 1961, que fue la 1ª vez en que se describió un IAAP en aves salvajes). En este periodo destaca un brote en pollos en Alemania, que afectó a 600 mil animales (más 80 gansos) y dos más en Irlanda (por H5N8) y Australia (por H7N7) que afectaron respectivamente a 307 mil y 240 mil aves pero, sobre todo, un gran brote que tuvo lugar en Pensilvania en 1983, por H5N2, que afectó a 356 granjas por IAAP evolucionado desde IABP (otras 90 granjas), con más de 17 millones de aves afectadas. También es destacable que en mayo de 1994 se identificó en México un H5N2 IABP y a finales de año se había identificado ya en 11 Estados con aumento de virulencia (mutación a IAAP), imponiéndose *stamping-out* y vacunación. Se desconoce el nº de aves afectadas. El 3º de los grandes brotes se produjo en Pakistán, por un H7N3, que en 1995 afectó al norte del país causando la muerte de más de 3,2 millones de aves (*broilers*). Se vacunó con vacuna homologa, a la vez que drásticas medidas de bioseguridad. La situación se complicó en 1998 con un H9N2 que se hizo endémico a la vez que la reemergencia de un IABP H7N3 en el año 2000, aplicándose vacunación con bivalente H7/H9. En 2003 se volvió a aislar el H7N3 IAAP y el virus pasó a ponedoras con 70-80% de letalidad. El diagnostico estuvo muy complicado por la presencia de subtipos IABP H7N3 o H9N2 (o ambos), sobre granjas infectadas con IAAP.

En el periodo **1996 y 2008 (-actual)**, los virus IAAP emergieron en 11 ocasiones, lo que equivale a un brote cada 1,18 años, mayor frecuencia que en el periodo anterior (37 años y 14 brotes epidémicos), pero sobre todo con mayor nº de aves implicadas y de modo particular la emergencia del sudeste asiático y la aparición de algunos subtipos con carácter zoonósico.

Brotes por el H5N1 IAAP y sus Variantes

Existe unanimidad en considerar que las epidemias por H5N1 IAAP, desde **1996**, han dejado pequeñas a cualquiera otras. El virus progenitor fue un IABP identificado como Gs/Gd/1/96, aislado de un brote en una explotación comercial de gansos en Guangdong (**1996**) con 40% de morbilidad, sin mortalidad, y gran eliminación de virus por tráquea y cloaca (infección experimental) que se transmitía bien a pollos y gallinas por vía fecal-oral y a la codorniz, muy susceptible, por cualquiera. Después el virus circuló en el sur de China persistiendo en **patos domésticos** y, en modo más limitado, en otras especies (hospedadores, no reservorios) contagiadas a partir de salvajes migratorias. Después, los IABP, por mutación, emergieron como **Gs/Gd/1/96 (H5N1), IAAP** (incorporación de 5 aa nuevos en el sitio de escisión de la HA).

El primer indicio de sus efectos devastadores fueron brotes sucedidos en 3 explotaciones de **pollos** en **Hong Kong**, entre **marzo-mayo de 1997**, reemergiendo después en noviembre (Shortridge, 1999). En el mismo año se produjeron 18 contagios humanos y de ellos, 6 fallecimientos. El IAAP H5N1 aislado de los enfermos y cadáveres, se consideró el resultado de un reordenamiento genético, con mezcla de genes de 3 orígenes: 1) del **IAAP A/Gs/Gd/1/96 (H5N1)** (que habría entrado en Hong Kong por el Sur de China, desde los gansos domésticos); 2) un **IABP A/quail/HK/G1/97 (H9N2)** y 3) finalmente, un **IABP A/teal/HK/W312/97 H6N1.** Se habría originado así un nuevo linaje IAAP causante del brote aviar y de los casos y fallecimientos humanos, que se identificó como **A/HK/156/97 H5N1**. Probablemente los reordenamientos se produjeron en las codornices. El virus replicaba bien en gansos y podía utilizar a los patos como reservorio, además de transmitirse a pollos y al hombre. Los casos humanos, esporádicos, respondían al contacto directo con las aves enfermas. Las autoridades de Hong Kong, entre el 29 de diciembre de 1997 y el 2 de enero de 1998 ordenaron el despoblamiento total de aves por *stamping out* y el linaje, en principio, se eliminó. Algunos autores consideraron que estas medidas habrían neutralizado la 1ª posibilidad de pandemia.

En **2000**, se detectó un **Gs/Gd/1/96 (**o semejante) en **patos domésticos**, con alguna diferencia y adaptado a estos, en calidad de reservorio adicional. Comenzó así la expansión del virus con nuevos eventos de reordenamiento con IABPs detectándose, por ej., **Gs/Gd/1/96** en los mercados de aves en **Hanoi (Vietnam)** con genes o fragmentos de los IABPs **H9N2 y H6N1.**

En Hong Kong, en **2001**, se detectaron **5 genotipos (A, B, C, D y E)**, variantes del Gs/Gd en aves domésticas. Aunque todos eran IABP, la gravedad de la infección era variable. En los mercados (principalmente en pollos, codornices y faisanes) se observó un incremento de la mortalidad, principalmente en pollos, lo que motivó una nueva despoblación de carácter preventivo. El **genotipo A** se caracterizaba por una deleción en la N1 que se presentaba de forma natural en los IABP de aves acuáticas y que se seleccionaba positivamente en las terrestres relacionándose con un cambio en el sitio de replicación de intestinal a respiratorio, con incremento de la virulencia para los pollos. En **2002**, entre enero y marzo, los brotes se extendieron y se sacrificaron casi 1 millón de aves. Los virus, IAAP, se clasificaron como **genotipos Z y Z+**. A comienzos de **2003**, se produjeron en Hong Kong 2 casos humanos por H5N1 IAAP (A/HK/213/03-like), que resultaron casi idénticos a los aislados del **genotipo Z+** de los brotes de finales de 2002 (aves salvajes). Los enfermos eran de la misma familia y probablemente se infectaron en China. En **2003-04** se produjeron 2 oleadas de brotes por el **genotipo Z** en Vietnam, Tailandia, Camboya, Laos, Indonesia y Malasia. El genotipo prevaleció sobre otros y se expandió por China y el Sudeste asiático. En él se diferenciaron el **clado 1**, que se expandió por la mayoría de los países antes citados y el **clado 2.1** que se asentó en Indonesia. La 2ª oleada se produjo partir de julio, con toda la avicultura afectada, sobre todo en patos criados en libertad, aves de corral, mercados y gallos de pelea (Martin *et al.,* 2006). Se pensó que se habían producido contactos con **aves salvajes** y que los patos (con apenas algunos signos), eran vectores.

Los primeros brotes por H5N1 en **aves salvajes** ocurrieron en dos parques con aves acuáticas en **Hong Kong en 2002** con varios niveles de gravedad (hasta mortal). pero **en 2005 ya se detectaron brotes en aves migratorias en China y en Mongolia**, mucho más significativos, como el que tuvo lugar en el **Lago Qinghai** en el que se detectó la presencia del virus en **gansos salvajes** (*Anser indicus*), y pese a producir la muerte, sería un medio probable por el que el virus se **difundiría en dirección Oeste y Sur**. En esa difusión hacia Europa, no se ha aclarado la responsabilidad de las aves salvajes o de los movimientos comerciales de las domésticas y parece que no se puede descartar a ninguno, aunque tal opinión no es compartida por todos. Como quiera que sea, al final, un H5N1 IAAP, relacionado genéticamente con los aislados del Lago Qinghai, alcanzó las aves domésticas en Rusia en verano de **2005**. Si desde allí difundió a otros países del Oeste asiático y algunos del Este europeo o si se introdujo de otra forma es una cuestión confusa. En cualquier caso, desde **2005** hasta marzo de **2006**, virus relacionados con el H5N1 se describieron en muchos países de la región.

En octubre de **2005** se aislaron **H5N1 IAAP** de **cisnes** muertos en **Croacia**. Ya se había advertido de la importancia de estos animales en la difusión y entre enero y abril de **2006**, se notificaron muchos aislamientos en **cisnes (*Cygnus olor*) y otras aves salvajes** en **Azerbaijan, Irán, Kazakhstan, Georgia y otros 20 países europeos**. Parece que los cisnes y otras aves, invernaron en el mar Negro, se infectaron y cuando se dispersaron en otras áreas hicieron lo propio con el virus aunque esto no explica la aparición al mismo tiempo de la misma cepa **(Lake Qinghai clado 2.2)**, en cisnes y otras aves salvajes en la costa del Báltico. A mediados de 2006 se habían reportado infecciones por H5N1 en aves en 26 países europeos, de los que la inmensa mayoría (25 países) reportaron infecciones en aves salvajes y solo 11 reportaron infecciones en aves domésticas. Suman también otros de Asia y África.

En **África,** el primer brote de H5N1 IAAP se registró en enero de 2006, en **Nigeria**, tanto de aves de explotación intensiva como de corral en la mayoría de las áreas, resultado de múltiples introducciones del virus. En aves domésticas, se registraron, además, focos en **Niger, Burkina Faso, Camerún, Costa de Marfil, Gana y Togo.** También en **Egipto, Sudan y Djibouti.**

En **2008**, las infecciones continuaron y se describieron brotes **en aves domésticas** en al menos **24 países de Europa, Oriente Medio, Asia y África**, mientras que en aves salvajes se notificaron en **China, Hong Kong y UK**.

Entre **2009 y 2016**, según la información disponible en la OIE, se produjeron **157** brotes a nivel mundial por el **H5N1 IAAP y H5**. En Europa se produjeron 17 brotes (8 en Rusia y ninguno entre 2011 y 2013), que representa algo más del 10,8% del total, mientras que la mayoría de brotes se produjeron en Asia, con 106 (el 67,5%) y el resto en África (principalmente) y América.

Otros brotes de IAAP (no H5N1) desde 1995

En 1997 en Australia (Nueva Gales del Sur) se produjo un brote por **H7N4** que afectó a 3 granjas y murieron o fueron sacrificados más de 300.000 aves. En ese año tuvo lugar en Italia el mayor brote registrado en 60 años; entre octubre y enero de 1998, un IAAP **H5N2** afectó a 8 pequeñas granjas con algo más de 6.500 aves, pero pronto se produjo una gran epidemia por un IAAP H7N1 de gran impacto. Las infecciones iniciales fueron causadas por un IABP **H7N1** (marzo de 1999) y en ausencia de una política rigurosa de control, el virus ya se había difundido en diciembre a otras 199 granjas, cuando se confirmó un IAAP en una explotación de pavos de carne, con alta mortalidad y caracterizado como H7N1, con un IPV de 3 y un sitio de escisión de la HA0 con la secuencia PEIPKGSRVRR*GLF, que comparada con la del virus IABP PEIPKGR*GLF, denotaba la inserción de aa básicos en el sitio de escisión. La presencia del IABP y la densidad de aves en el área, difundió el IAAP a 413 granjas. Se puso en práctica la despoblación de las granjas de pollos, asi como de pavos, en un área de 5.500 km². El último brote se registró en abril de 2000 y como balance total supuso la muerte o sacrificio de >13 millones de aves.

El brote de Chile de 2002 fue el primero en Sudamérica, producido por un subtipo **H7N3** IAAP, cuyo sitio de escisión de la HA_0 estuvo caracterizado por PEKPKTCSPLSRCRETR*GLF, una secuencia extremadamente inusual, al parecer debido a la recombinación entre el gen de la HA y de la NP de un virus progenitor IABP. El brote inicial se produjo en una gran explotación de 617.800 *broilers* que fueron eliminados por *stamping out*, con destrucción de 116.000 huevos en incubación. El virus se difundió después a una explotación de pavos a 4 km.

En Holanda, los brotes causados por un IAAP **H7N7** se iniciaron en febrero de 2003 en un área densamente poblada y se difundió rápido. Al final, se confirmaron 255 brotes, pero como resultado de la política de sacrificios preventivos para controlar la difusión, fueron vaciados un total de 1.255 explotaciones comerciales intensivas y 17.421 explotaciones de pequeño tamaño, domésticas; en total 25,6 millones de aves muertas o sacrificadas. A mediados de abril, la enfermedad se difundió a Bélgica y produjo 8 brotes y la muerte-sacrificio de 2,3 millones de aves. Un único brote que tuvo lugar en Alemania, que cerró sus fronteras con Holanda, causó la muerte o sacrificio de más de 419.000 aves.

Otro brote de efectos devastadores tuvo lugar en Canadá en febrero de 2004. Un virus IABP del subtipo **H7N3**, con un sitio de escisión de la HA PENPKTR*GLF y un IPV de 0, fue aislado a partir de aves en lo que parece ser el caso índice. Sin embargo, se infectó una segunda granja, también con un virus H7N3 IABP, junto con un IAAP que presentaba un IPV de 2,96. Este segundo virus (IAAP) presentaba un sitio de escisión en la HA de

PENPKQAYRKRMTR*GLF que parecía haberse originado como consecuencia de la recombinación con otro, resultando en la inserción en el sitio de escisión, de 7 aa. El virus pareció estar difundiéndose a través de la densa población de aves de Fraser Valley (en la Columbia británica) y se decidió aplicar preventivamente una política de sacrificio de las aves del área. En total, se infectaron 42 explotaciones comerciales y 11 pequeñas explotaciones familiares, que sumaron 1.204.564 aves, a lo que se sumaron 16 millones de aves que fueron sacrificadas. En 2007 se produjo en Saskatchewan un brote en una única explotación de broilers, también por **H7N3** IAAP.

En **2004,** varios brotes que tuvieron lugar en Sudáfrica, implicaron a 37 granjas de avestruces que se infectaron con un IAAP **H5N2**, que presentaba un sitio de escisión de la HA_0 con la secuencia PQREKRRKKR*GLF, pero no existen evidencias de que pasara a las aves domésticas comerciales.

Un resumen de la situación entre 2009 y 2016, según la OIE, en lo que se refiere a **otros tipos de IAAP** presentaría un total de 120 brotes, 101 por H5 (la mayoría -61 por H5N8-, seguido de H5N6, H5N2 y H5N3) y 19 por H7 (la mayoría -8- por H7N3, seguido de H7N7, H7N1 y H7N2). Del conjunto, en Europa se se describieron 37 y 83 en el resto.

ASPECTOS DE SALUD PÚBLICA

La última actualización disponible de los casos humanos por H5N1 IAAP, se recogen en el resumen de la OMS, de 15 de junio pasado, con un total acumulado desde 2003, de 859 casos y 453 fallecimientos, que supone un % de mortalidad medio del 52,73%. Del total de 16 países que han descrito casos, figura a la cabeza Egipto, con 359 casos y 120 fallecimientos (mortalidad del 33,42%), seguido de Indonesia (199 casos y 167 fallecimientos, que da el porcentaje de letalidad más alto, del 83,91%). En tercer lugar, Vietnam, con 127 casos y 64 fallecimientos (mortalidad del 50,39%). Con menor número de casos, pero % de mortalidad por encima del 50% se sitúan Camboya (56 casos y 66,07% de mortalidad), China (con 53 casos y 58,49% de mortalidad) y Tailandia (con 25 casos y mortalidad del 68%).

La continua difusión del H5N1 IAAP en las poblaciones de aves domésticas en varios continentes, junto con el creciente número de infecciones humanas por desbordamiento o salto de la barrera de especie, ha despertado gran interés de los medios especializados y científicos, acerca de la posibilidad que pudiera derivarse una posible pandemia. Como ya hemos señalado, los primeros casos humanos se produjeron en Hong Kong en 1997. Su reemergencia en 2003 fue seguida de la difusión a otros países del sudeste asiático, Europa y África. Todavía, este mismo año se han producido hasta el mes de junio, 3 casos y 1 fallecimiento en Egipto.

Aunque el H5N1 ha eclipsado en este tipo cualquiera otra amenaza de este tipo, debe recordarse que ha habido también otras emergencias por nuevos subtipos H5 ó H7 o incluso H9, algunas de las cuales han producido contagios humanos y más raramente, fallecimientos. Desde mediados los años 90, cepas IABP de H9N2 se han hecho endémicas en aves domésticas produciendo un pequeño número de infecciones humanas y algunas cepas han adquirido especificidad para el receptor humano. Como hemos descrito, en 2003, un brote por H7N7 IAAP causó en Holanda un grave brote epidémico en aves que se difundió a Bélgica y Alemania y antes de controlarse la epidemia, al menos 86 empleados y 3 de sus contactos se infectaron y desarrollaron conjuntivitis con/sin signos de influenza y uno de ellos falleció. De forma semejante, también se describieron casos de conjuntivitis en un brote (H7N3) en Canadá en 2004.

Sin embargo, las epidemias por H5N1 son únicas al producir, además de infecciones, muertes en un gran número de especies de aves y ocasionalmente en mamíferos, e infecciones humanas mortales por desbordamiento y en casos raros, posible transmisión interhumana "a término", sobre lo cual se ha cuestionado la posibilidad de que el H5N1 sea capaz de originar una pandemia. A pesar de toda la investigación, existen cuestiones fundamentales como el modo en que los virus influenza A cambian de hospedador desde las especies de aves salvajes a las domésticas y a los mamíferos y, consecuentemente al hombre, que permanecen sin respuesta. También se comprende mal todavía los cambios genéticos que condicionan la adaptación al hombre y peor los necesarios para la transmisión interhumana o los cofactores del virus, del hospedador o ambientales que podrían contribuir a ello y a la patogenicidad en el hombre. Aunque las observaciones históricas hacen inevitable futuras pandemias, los datos de las décadas pasadas para algunos autores no apuntan necesariamente a la emergencia de una posible pandemia por H5N1 (Taubenberger y Morens, 2009), considerando por ej.,:

1-Que el H5N1 está evolucionando muy rápido, pero la dirección de esa evoluciones confusa e imprevisible. A la vez que se mantiene la HA del virus Gs/Gd de 1996, se han producido otras mutaciones en genes diferentes, además de reordenamientos con otros virus de influenza aviar. Además, la adaptación de las cepas asociadas con la infección endémica y asintomática de los patos, probablemente este contribuyendo al desbordamiento hacia los pollos, manteniendo un pool de virus IAAP a los que está expuesto el hombre. En cualquier caso, la información sobre si H5N1 está evolucionado o no en dirección a la adaptación humana, sigue siendo muy limitada.

2-Solo los H5 y H7 son capaces de sufrir mutaciones polibásicas insercionales en el sitio de escisión de la HA, que les convierte en IAAP para las aves domésticas. Las tres últimas pandemias de virus humanos que contienen genes HA similares a los virus aviares (H1, H2 y H3), serían virus IAAP, pero no existe ninguna evidencia de que una pandemia o epidemia humana haya sido causada por cualquiera de los muchos otros virus IAAP. Además, mientras que los brotes IAAP han sido descritos en aves desde hace más de 130 años, ninguna de las últimas tres pandemias estuvo asociada temporalmente con una epidemia en aves ni existe ningún dato histórico que soporte la posibilidad de que las aves puedan servir como intermediarios de una pandemia.

3-Las barreras biológicas para modificar los virus con combinaciones de segmentos génicos se conocen mal, pero patogenicidad y virulencia, adaptación y transmisibilidad probablemente son propiedades independientes, asociadas con mutaciones. No está claro cómo se comportan virulencia y patogenicidad en las interrrelaciones entre virus y sus hospedadores, pero virus pandémicos de diferente patogenicidad (alta, baja o intermedia) y con transmisibilidad eficiente, siempre estuvieron adaptados al hombre.

4-Para causar una pandemia, un virus aviar debería adaptarse, como mínimo, a los receptores de HA humanos y adquirir separadamente propiedades de transmisibilidad interhumana. A pesar de la probabilidad de que el hombre y otros mamíferos hayan estado expuestos a incontables virus aviares a lo largo de muchos siglos, las ultimas 2 pandemias han sido el resultado del reordenamiento de virus pre-existentes ya adaptados al hombre, con genes importados de origen aviar. Cuando los genes del H5N1 de 1997 se reordenaron experimentalmente en combinaciones con los del virus humano H3N2, algunas combinaciones de reordenación fueron capaces de replicar en los hurones, pero ninguna fue capaz de transmitirse eficientemente entre los animales, planteando incluso cuestiones como si tal vez los H5N1 podrían tener limitado su potencial para adaptarse y transmitirse entre humanos.

5-Las mutaciones que se asocian con la unión a los receptores en diferentes hospedadores, son muy complejas. La adaptación del receptor al sitio de unión requiere pérdidas de especificidad para el ácido siálico

unido a α-2,3, en favor de un incremento de la especificidad por el ácido siálico unido a α-2,6. Parece que solo 2 mutaciones en el sitio de unión con el receptor han convertido las HAs de H1, H2 y H3 de las 3 últimas pandemias, de un receptor aviar a un receptor humano. Para incrementar la capacidad de unión del H5 al receptor humano se han descrito varias mutaciones, pero ninguna para inducir un cambio completo en la especificidad. Aunque es posible que una mutación desconocida adicional pudiera permitir ese cambio, no existen pruebas de que eso haya sucedido desde 1997 y eso que, desde entonces, miles de humanos han estado expuestos al virus, como tampoco existe ninguna evidencia de que esto pueda esperarse que pueda suceder con otros IAAP o IABP. Los cambios en el receptor de la HA durante la adaptación al hospedador, para lograr una unión eficiente a los receptores humanos, deben ser complejos y diferentes según el subtipo, para superar las barreras biológicas.

También se puede contemplar, contrariamente, que estos virus busquen adaptarse a las aves (domésticas y/o salvajes). Al final, resulta que es muy difícil predecir la evolución en el H5N1, ni dónde ni cómo, o qué debemos esperar y como debemos planificarnos para ello. Siempre, en cualquier caso, la Naturaleza, será imprevisible.

PATOGENICIDAD

Debido a las razones que hemos venido señalando, los virus de la influenza aviar IABP pueden replicar solamente en tejidos localizados (del tracto digestivo y respiratorio, según el caso), mientras que los IAAP son capaces de replicarse sistémicamente, en la mayoría de los órganos y tipos de células. Por otra parte, desde el punto de vista del hospedador, otros factores determinan también la patogénesis, incluyendo la especie, la edad en la que se produce la infección, el estado inmunitario o la coincidencia de otras infecciones.

En las **gallináceas**, la **infección por IABP** puede dar lugar a un proceso clínico o subclínico. El cuadro clínico se caracteriza por alta morbilidad (superior al 50% de las aves) y baja mortalidad (menos del 5% de las aves) que puede incrementarse como consecuencia de infecciones secundarias, sobre todo en aves jóvenes, inmunodeprimidas y en ponedoras. Puede observarse signos inespecíficos (aislamiento en un rincón acurrucadas, depresión, anorexia, pierden peso o presentan plumas erizadas, además de signos respiratorios como toses, estornudos, ruidos anormales, estertores, etc., caída en la puesta y de su calidad -fragilidad de la cáscara-) y ocasionalmente también, diarrea. Los brotes de IABP son más frecuentes en pavos.

Las lesiones varían dependiendo del hospedador y del virus. En el tracto respiratorio se observa rinitis, sinusitis, laringitis y traqueítis, desde catarral a fibrinosa. Edema infraorbital (sobre todo en pavos) con exudado, de mucoide a caseoso. En la tráquea se observa edema, congestión y hemorragias; ocasionalmente un exudado caseoso ocluye el lumen y llega a producir la muerte por sofocación. Puede haber congestión y edema pulmonar y con infecciones bacterianas secundarias se observa bronconeumonía y aerosaculitis. En ponedoras puede observarse peritonitis (yema de huevo en la cavidad abdominal), salpingitis (desde catarral a fibrinosa), regresión ovárica y hemorragias en los folículos ováricos. La caída de la puesta puede ir acompañada de huevos deformes y despigmentados. Otros cambios incluyen enteritis, tiflitis y lesiones en páncreas (áreas hemorrágicas y de necrosis, sobre todo en pavos), además de atrofia de la bursa. Al microscopio se observa conjuntivitis, rinitis, sinusitis, traqueítis y bronquitis. Puede haber neumonía y nefrosis, necrosis renal tubular y nefritis intersticial en infecciones experimentales por vía endovenosa. Depleción linfocítica, necrosis y apoptosis a nivel de tejidos linfoides y en las células epiteliales del tracto respiratorio, intestino, riñones, páncreas y oviducto se identifica Ag viral.

Los virus IAAP producen una enfermedad sistémica con alta mortalidad (hasta el 100% en pollos y pavos) por fallo multi-orgánico y daño cardiovascular y en el sistema nervioso, con necrosis y apoptosis, que se asocia con títulos altos de virus y abundante Ag viral en los tejidos. Se produce alteración de la permeabilidad vascular y daño endotelial que origina edema, hemorragias, trombosis vascular diseminada e isquemia tisular. Como en IABP, son factores determinantes la cepa viral, la especie animal y la edad, así como el estado inmune. Los virus se replican 1º en las células epiteliales del respiratorio superior, seguido de la infección del endotelio de los capilares en la submucosa y después en el sistema sanguíneo general. Se replican en los heterófilos, pero también en macrófagos y células endoteliales y se diseminan tanto por vía sanguínea como por vía linfática a diferentes órganos y tejidos. El tropismo puede variar pudiendo ser principalmente epiteliotropo, endoteliotropo, neurotropo o pantrópico. Las lesiones cerebrales se asocian siempre con infección del endotelio vascular seguido de diseminación del virus en el neuroparénquima. La viremia (algunos virus) se asocia con la replicación (mínima) en el endotelio y tales virus se mantienen de forma prolongada, aunque en tales casos todavía se produce más daño debido a la gran replicación (en SNC, corazón, páncreas y anterrenales) (Swayne *et al*., 2013). El cuadro clínico varía en función de los órganos afectados, la duración y gravedad de le enfermedad, la especie aviar y el tipo y cepa de virus.

La difusión de la enfermedad es rápida y el pico de muertes se produce entre 3-5 días en aves criadas en el suelo y más lento en aves en jaula en las que puede retrasarse hasta los 10-15 días. En pavos domésticos, los signos pueden ser inaparentes, igual que en los pollos, hasta que la muerte se produce de forma súbita. En estos casos de enfermedad aguda o peraguda, puede haber marcada depresión, letargo, dificultades para mantenerse en pie e incluso estado comatoso. Se reduce el consumo de pienso y agua y una caída drástica de la puesta. (França, 2014). Suele ser característico el silencio en los gallineros por reducción de la vocalización normal en las aves. Los animales que sobreviven pueden presentar signos neurológicos, incluyendo incoordinación, tremor de cabeza y cuello, tortícolis, opistótomos, movimientos en círculo, paresia y parálisis. Pueden verse signos respiratorios (tos, estornudos y estertores), aunque estos son más raros. Otras gallináceas diferentes de pollos y pavos, generalmente presentan cuadros similares, aunque sobreviven tiempos mayores.
Las lesiones en las gallináceas dependen de la especie, la edad y el virus. En cuadros peragudos no se observan o todo lo más órganos internos congestivos. En los pollos con enfermedad aguda, se observa hinchazón de la cara, cresta, cuello y patas, con edema y hemorragias (zonas no cubiertas de plumas). En conjuntiva o pulmón se observa congestión, edema y hemorragias que pueden verse igualmente en mucosas y serosas del tracto gastrointestinal y con más intensidad en el proventrículo y ventrículo. La bursa y el timo están atrofiados y al microscopio puede observarse necrosis multi-orgánica e inflamación, más frecuentes en cerebro, corazón, pulmones, páncreas, órganos linfoides, etc. En el corazón manguitos perivasculares de linfocitos y en el cerebro necrosis neuronal, gliosis, edema, meningitis, inflamación del plexo coroides etc.

En **aves salvajes anseriformes**, patos o ánades reales, la **influenza aviar por IABP**, mantiene como sitio de replicación vírica los enterocitos (tracto intestinal) y si se trata de animales jóvenes, en la bursa. En tales ubicaciones, la replicación se asocia, con la eliminación de grandes cantidades de virus en heces, que pueden superar las 10^7 EID_{50}/g, aunque también puede asociarse a la replicación en el epitelio del tracto respiratorio superior (de menor intensidad y limitada a los primeros días). En cualquier caso, susceptibilidad y extensión de replicación y eliminación de virus varían en relación con el virus y depende del grado de adaptación del virus (los virus de aves acuáticas replican más eficientemente en patos que los virus aislados de pollos, gaviotas o mamíferos). Es característico que, pese a los niveles altos de replicación y eliminación viral, signos y lesiones son muy raros, aunque puede haber efectos subclínicos (cambios en la ganancia de peso, comportamiento, función inmune o reproducción) (França and Brown, 2015). No obstante, en descripciones en patos y gansos salvajes, se confunden los factores asociados a los brotes (co-infecciones, estrés, rutas de infección no naturales y otras) que pueden dificultar la asociación infección con IABP y signos clínicos que,

cuando se observan, son inespecíficos. Las lesiones o son débiles o ausentes y, en el primer caso, hacen referencia a tipo respiratorio.

Respecto de la influenza aviar por IAAP, la mayoría de los linajes no producen efectos en aves salvajes, reservorios con resistencia natural asociada a la adaptación o debido a la inmunidad innata y la expresión de RIG-I, un mecanismo antiviral que media la respuesta de interferón, descrito en las células de los patos y aparentemente ausente en las células de los pollos.

El caso de los H5N1 IAAP merece, desde este punto de vista, un tratamiento particular, pues algunos virus del **linaje euroasiático** emergidos en 2002 (linaje Qinghai), son virulentos para aves domésticas y también para aves acuáticas salvajes. La patogenicidad varía con el virus y el hospedador, yendo desde infecciones asintomáticas con niveles bajos de eliminación de virus y sin lesiones, hasta agudas y mortales con replicación extensa del virus y lesiones en múltiples órganos viscerales y en el cerebro. Algunas especies de cisnes, gansos y patos buceadores son altamente susceptibles a la infección que se relaciona con morbilidad y mortalidad en ocasiones súbita (los animales se descubren muertos). Cuando se detectan signos son generalmente neurológicos, con ataxia, depresión, debilidad y convulsiones. La replicación del virus y las lesiones se asocian con estas especies susceptibles y afectan de forma extensa al SNC y SNP. A semejanza de las gallináceas, la replicación y las lesiones se detectan en páncreas, anterrenales, cerebro y corazón, siendo menos frecuente en sacos aéreos, pulmones, bazo y riñones.

Por último, en **charadriiformes** (gaviotas, charranes y aves costeras), aunque sus patrones epidemiológicos de infección son diferentes, los elementos básicos son comunes. En las gaviotas los subtipos más frecuentes son H13 y H16, que están fuertemente adaptados. Más allá del linaje euroasiático del H5N1, el brote más importante en estas aves se produjo en charranes comunes en Sudáfrica en 1961 por **H5N3** IAAP con alta mortalidad (más de 1.300) y signos inespecíficos.

DIAGNÓSTICO Y CONTROL

Diagnóstico

El diagnóstico directo de la influenza aviar exige el aislamiento y caracterización del virus, para lo que se puede utilizar muestras de diferentes órganos o secreciones cloacales u orofaríngeas, ordinariamente tomadas con hisopo (Alexander, 2008) que se inoculan en embriones de pollo (cavidad alantoidea o membrana corioalantoidea). Directamente, del virus aislado o de líquido alantoideo, es muy común el uso de la hemaglutinación o inhibición de la hemaglutinación. Las recomendaciones de la OIE, incluyen las siguientes:

En lo que se refiere al **aislamiento e identificación** del virus a partir de muestras de aves sospechosas, en el capítulo 2.3.4 del Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas, se señala literalmente: *"Se inoculan en la cavidad alantoidea de embriones de pollo de 9–11 días suspensiones obtenidas a partir de hisopos orofaríngeos o cloacales (o heces) tomados de aves vivas, o de heces y muestras de órganos de aves muertas en una solución de antibióticos. Se incuban los huevos a 37°C (o 35-39°C) durante 2–7 días. En el líquido alantoideo de aquellos huevos que contienen embriones muertos o moribundos durante la incubación y en todos los huevos en el periodo final de incubación se determina si hay presencia de actividad hemaglutinante. La existencia de virus de la influenza tipo A puede confirmarse mediante una prueba de inmunodifusión entre el virus concentrado y un antisuero frente a los antígenos de la nucleocápsida y/o de la matriz, ambos comunes en todos los virus de la influenza tipo A, o bien mediante la reacción en cadena de la polimerasa con*

transcripción inversa (RT-PCR) con líquido alantoideo. El aislamiento en embriones se ha sustituido recientemente, en algunos casos, por la detección directa en muestras de uno o más segmentos del genoma de la influenza tipo A mediante RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) u otras técnicas moleculares validadas. Para la subtipificación serológica del virus, un Laboratorio de Referencia debe llevar a cabo pruebas de inhibición de la hemaglutinación y de la neuraminidasa contra una batería de antisueros policlonales o monoespecíficos frente a cada uno de los subtipos del virus de la influenza tipo A, determinados por 16 hemaglutininas (H1-H16) y 9 neuraminidasas (N1-9), o bien identificar el genoma de subtipos H y N específicos utilizando tecnologías de detección de ARN con cebadores y sondas específicos de subtipo (por ejemplo, la rRT-PCR) o secuenciación y análisis filogenético".

Para la determinación de la patogenicidad (virus IAAP o IABP) todavía se mantiene la inoculación intravenosa del virus infeccioso a un mínimo de 8 pollos susceptibles de 4–8 semanas. Las cepas se consideran IAAP si causan más de un 75% de mortalidad en 10 días o si la inoculación de 10 pollos susceptibles de 4 a 6 semanas de edad da un índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) de 1,2. Alternativamente, los virus H5 ó H7 con una secuencia de aa en el punto de escisión de la HA0 similar a cualquiera de las observadas en virus altamente patógenos son considerados virus de la influenza A IAAP y las que carecen de ellos se consideran IABP.

En las **pruebas serológicas,** los Ags N y M son de elección para la detección de Ac. Se puede disponer de pruebas de precipitación en gel con uno o ambos antígenos. También se puede utilizar alternativas de ELISA (indirecto o de competición) o pruebas de inhibición de la hemaglutinación.

En la actualidad se utilizan diferentes **métodos moleculares** de RT-PCR (*reverse transcriptase*-PCR) que además de su sensibilidad, mayor rapidez y especificidad, suponen menor riesgo de contagio para los técnicos. La recomendación de la OIE se basa en el uso de tecnología TaqMan y del gen M como diana, que detecta los subtipos H5 y H7. También se recomienda el uso de una RT-PCR para amplificar el sitio de escisión de la HA de ambos subtipos, con el propósito de determinar la secuencia de nucleótidos. Los positivos deben verificarse mediante aislamiento vírico o por PCR convencional, seguido de la secuenciación.

Para diferenciar de la enfermedad de Newcastle se puede utilizar PCR multiplex o microarrays de oligonucleótidos. Las variantes IAAP y IABP se pueden diferenciar por pruebas de virulencia.

En la actualidad se han propuesto diversos formatos de PCR (RT-PCR de una fase, Late-PCR, PCR-Lux o métodos de amplificación isotérmica) que reducen el tiempo de ejecución y la facilitan, aumentando la sensibilidad y especificidad, principalmente para los tipos H5, H7 y H9. Algunas estrategias como la pirosecuenciación, mejoran el rendimiento diagnóstico de la RT-PCR. Se puede determinar patogenicidad, unión al receptor, caracteres de la glicosilación o filogenéticos del H5N1. La diferenciación de IAAP/IABP se llevan a cabo mediante la secuenciación del sitio de escisión del gen de la HA. Entre las últimas propuestas se incluyen *microarrays* que detectan simultáneamente miles de elementos genéticos y pueden utilizarse para definir relaciones filogenéticas entre los aislados.

CONTROL

El **Programa de Vigilancia** elaborado por el Ministerio de Agricultura para las **aves domésticas**, pretende informar sobre la circulación del virus de la influenza aviar en España, sobre un sistema estratificado representativo que se basa en las recomendaciones de la Decisión 2010/367/EU. El sistema está diseñado sobre **pruebas serológicas** para las 17 comunidades autónomas según cada categoría de ave, mediante la vigilancia activa en aves de corral, de infecciones subclínica IABP de los subtipos H5 y H7. Las medidas de

bioseguridad se establecen según el riesgo definiéndose unas zonas de riesgo que se basan en la abundancia de aves salvajes o de pasos migratorios, densidad de explotaciones de aves domésticas, dificultades para lograr un aislamiento correcto entre ambas, etc. donde las medidas preventivas se realizan con mayor rigor, y zonas de especial vigilancia, con medidas similares, pero de menor intensidad.

En lo que hace referencia a las **aves silvestres**, el objetivo es detectar el subtipo H5N1 IAAP con el fin de proteger las domésticas, sobre las mismas recomendaciones. Se establece un sistema de vigilancia pasiva (aves encontradas muertas o moribundas, principalmente acuáticas migratorias de especial riesgo). El programa enumera un listado de 16 tipos de aves que son completadas con otras de alto riesgo incluidas en la Decisión.

La influenza aviar está recogida en el RD 526/2014, del 20 de junio, por el que se establece la lista de enfermedades animales de declaración obligatoria y se regula su notificación. En el caso de aves silvestres la vigilancia se realiza recogiendo hisopos cloacales, traqueales y orofaríngeos y muestras tisulares en los cadáveres (encéfalo, corazón, pulmón, tráquea, riñón e intestino). La Directiva 2005/94/CE regula las medidas comunitarias de lucha contra la IA.

VACUNACIÓN

Aunque en España está prohibida la vacunación de las aves domésticas frente a la influenza aviar (interfiere con otras políticas de control mediante despoblación), si que se ha utilizado en casos de brotes, especialmente en el sudeste asiático y también en algunos lugares de América. Si nos hacemos eco de las manifestaciones recogidas en el Manual de la OIE, cuando las vacunas se administran adecuadamente, son capaces de proteger tanto frente a la influenza IABP como IAAP reduciendo los signos clínicos y la mortalidad, así como la diseminación de virus al reducir su excreción, reduciendo en consecuencia las posibilidades de exposición por contacto. No obstante, la mayoría de normas de control internacional, incluyen el derecho a utilizar vacunas en casos de emergencia. En cualquier caso, las vacunas no impiden la infección ni la replicación del virus, como se ha demostrado experimentalmente en aves SPF vacunadas y clínicamente sanas, cuando se utilizan altas dosis de desafío. Además, se alerta a que los datos obtenidos por vacunación en una especie concreta de ave, no son extrapolables a otras.

Se dispone de vacunas recombinantes mediante la utilización del gen de la HA en vectores adecuados, habitualmente virus carentes de peligro (virus de la viruela aviar atenuado, por ejemplo). Tales vacunas proporcionan inmunidad de mucosas, humoral y celular y se pueden administrar a aves jóvenes, permitiendo diferenciar entre animales vacunados e infectados (vacunas DIVA) al no producir Ac frente a la NP o la M. Adolecen, sin embargo, este tipo de vacunas, de que no replican de forma satisfactoria y solamente inducen inmunidad parcial en aves que hayan estado expuestas de forma natural al virus vector o hayan sido vacunadas con dicho virus. Por otra parte, si se utilizan en aves de un día o aves jóvenes, el efecto de los Ac maternos frente al vector puede variar según el tipo de éste y el nivel de los Ac (que, por ejemplo, puede haber aumentado debido a una infección o vacunación previas). El uso de estas vacunas está restringido a aquellos que las tienen autorizadas; por ejemplo, una recombinante de H5 preparada con el virus de la viruela aviar como vector, se ha utilizado en varios países de América Latina (El Salvador, Guatemala o México), además de China y EE.UU., principalmente frente a virus IAAP H5N2.

Recientemente se han utilizado vacunas vectorizadas con herpesvirus del pavo que contienen insertos de la H5 igual que con el virus de la enteritis del pato. La primera de ellas se ha utilizado en Egipto y EE.UU., mientras que la segunda está pendiente de autorización en China y en ambos casos, se han utilizado en la

prevención frente al H5N1 IAAP. Un problema común, sin embargo, es que normalmente la inmunidad conferida con una sola dosis, suele ser escaso, por lo que se completa con una segunda dosis con una vacuna inactivada o con la propia vectorizada.

Se han utilizado también sistemas de expresión de la HA en plataformas de adenovirus, baculovirus, salmonelas atenuadas, virus vaccinia, de la leucosis aviar, alfavirus o virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar. Igualmente se ha evaluado ADNc que codifica para la H5, como posible vacuna.

Bibliografía

Alexander, D.J. 2008. Zoonosis Public Health, 55(1):16-23
Alexander, D.J. and Brown, I.H. 2009. Rev. Sci.Tech. 28(1):19-38
Compans, R.W. and M.B.A. Oldstrone. Edit. Influenza Pathogenesis and Control. Springer 2014
Directiva 2005/94/EC. Medidas de lucha contra la influenza aviar
França, M.S. 2014. Curr. Top Microbiol Immunol 385:221-224
Guan, Y. et al., 2002. PNAS, 99:13, 8950-55
MAPAMA. Manual de operaciones en la lucha contra la IA, Plan coordinado estatal de alerta sanitaria veterinaria. Guía de actuación en caso de sospecha de IA y EN. Protocolo de remisión de muestras. Programa de Vigilancia de la IA en España, 2017
MAPAMA. RD 526/2014. Lista de enfermedades de declaración obligatoria y notificación
Martin, V. et al., 2006. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1081:153-162
Pantin-Jackwood et al., M.J. 2009. Rev. Sci.Tech, 28(1), 113-136
Shortridge, K.F. 1999. Lancet 354 Supl: SIV29
Righeto et al. 2014. BMC Bioinformatics, 15:363 doi.org/10.1186/s12859-014-0363-5
Swayne, D.E. 2007. Avian Dis. 51(1 Suppl), 242-249
Swayne, D.M. The global nature of avian influenza. Wiley. 2016
Taubenberger, J.K. and Morens, D.M. 2009. Rev.Sci.Tech... 28(1)187-202
Wu, L.C. et al. 2008. IEEE Trans Infec. Technol. Biomed, 12(6)689-695
Yoon, S.W. et al., 2014. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 385:359-75