

# REIAL ACADÈMIA DE FARMÀCIA DE CATALUNYA

## DISCURS

llegit a l'acte d'ingrés de l'Acadèmic Corresponent

**Il·ltre. Prof. Dr. Tomàs Pumarola Suñé**

celebrat el dia 25 de novembre de 2009

## PRESENTACIÓ

A càrrec de l'Acadèmic Numerari

**Molt Il·ltre. Prof. Dr. Àngela Domínguez García**

# **ELS VIRUS DE LA GRIP. PATÒGENS EN CONSTANT EVOLUCIÓ**

DISCURS

Ilegit a l'acte d'ingrés de l'Acadèmic corresponent  
**Il·ltre. Prof. Dr. Tomàs Pumarola Suñé**  
celebrat el dia 25 de novembre de 2009

PRESENTACIÓ

A càrrec de l'Acadèmic Numerari  
**Molt Il·ltre. Prof. Dr. Àngela Domínguez García**

**Barcelona  
2009**

**PRESENTACIÓ DEL NOU ACADEMIC CORRESPONENT, IL·LUSTRE PROF. DR. TOMÀS PUMAROLA SUÑÉ, PER PART DE L'ACADEMIC NUMERARI MOLT IL·LUSTRE PROF. DR. ÀNGELA DOMÍNGUEZ GARCÍA**

***Excel·lentíssim Senyor President,  
Molt Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,  
Senyores, Senyors,***

L'ingrés d'un nou acadèmic a la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya és sempre motiu de satisfacció, perquè una persona que té una trajectòria acadèmica, científica i professional rellevants contribuirà a partir d'ara que aquesta docta corporació pugui desenvolupar les funcions que li són pròpies amb més capacitat i, consegüentment, que la seva aportació a la societat sigui una mica més gran.

Avui tinc la satisfacció de fer la presentació de Tomàs Pumarola i Suñé, que neix a Barcelona l'any 1957, fill de l'il·lustre catedràtic de Microbiologia de les universitats de Salamanca i Barcelona Agustí Pumarola i Busquets, referent per a molts professionals de la microbiologia i de la salut pública del nostre país.

Ben segur que l'excel·lent trajectòria del seu pare, que va obtenir la plaça de catedràtic a la Universitat de Salamanca l'any 1958, i on va anar amb tota la família (incloent-hi el Tomàs, que tenia llavors 1 any) a exercir aquesta plaça, per tornar a Barcelona l'any 1964, va marcar la vocació del Tomàs i la seva decisió de començar la llicenciatura de Medicina i Cirurgia, que va acabar brillantment l'any 1981.

La trajectòria del seu oncle, Fèlix Pumarola i Busquets, acadèmic numerari d'aquesta Reial Acadèmia, igualment metge i dedicat a la Salut Pública en la vessant més salubrista —va ser el cap provincial dels Serveis de Sanitat a Barcelona durant molts anys—, de ben segur que també va influir en l'orientació de la seva carrera professional.

Jo vaig conèixer el Tomàs el 1981, quan feia, en el sisè any de la llicenciatura, l'assignatura Higiene i Sanitat, que impartia la càtedra dirigida pel professor González Fusté i a la qual tot just jo m'acabava d'incorporar com a professora ajudant de classes pràctiques.

Un cop va acabar la llicenciatura, amb la qualificació d'excel·lent, en Tomàs va guanyar un concurs de mèrits per ocupar una plaça de professor

ajudant de classes pràctiques de Microbiologia de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona, que va deixar per ocupar posteriorment la de professor col·laborador de docència i investigació a la mateixa facultat.

La seva formació com a MIR de Microbiologia a l'Hospital Clínic de Barcelona durant el període 1983-1986 va servir per consolidar i ampliar els aprenentatges que havia tingut en el camp de la microbiologia.

L'any 1986 va obtenir per concurs oposició una plaça de professor titular de Microbiologia de la Universitat de Barcelona i nou anys després, el 1995, la de catedràtic de Microbiologia.

Un aspecte que vull destacar de la seva formació és el capítol d'estades a l'estranger: va estar de 1984 a 1986 al Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (Nova York, EUA). Aquest temps de formació va ser molt important per a la seva trajectòria, ja que li va permetre reincorporar-se l'any 1987 amb una plaça d'especialista (adjunt) a l'Hospital Clínic, a on ocupa actualment la plaça de cap de Secció de Virologia.

Entre les seves activitats en el camp de la virologia destaquen els treballs realitzats en relació amb la infecció pel virus de la immunodeficiència humana i amb el virus de la grip, tema, aquest últim, que ha escollit per al discurs d'ingrés i amb la lectura del qual mostrarà la seva gran expertesa. Aquella expertesa que permet expressar de manera fàcil però contundent conceptes i situacions que són extremadament complexes, com podran tots vostès comprovar quan acabi de fer la seva lectura.

Precisament, el tema de la grip és el que m'ha donat l'ocasió de treballar amb ell des de l'any 1999 i el que m'ha permès conèixer i apreciar els seus coneixements i les seves qualitats professionals i humanes. L'activitat de vigilància epidemiològica de la grip que s'ha dut a terme al Departament de Salut ha comptat sempre amb el suport del nou acadèmic, i les meves paraules no poden ser més que d'elogi: pel seu afany de portar-nos els coneixements del virus sempre actualitzats, per la seva accessibilitat, i per haver estat sempre pendent que les dades dels laboratoris, tan necessàries per poder concloure com evoluciona la grip a la comunitat, estiguessin a punt quan calia.

La seva trajectòria de recerca ha estat brillant i de gran interès tant per al món de la virologia com per al món de la salut pública, com indica la seva

participació en 18 projectes de recerca finançats per ajudes obtingudes en convocatòries competitives i dels quals en 6 ha estat ell l'investigador principal.

Com no podia ser d'altra manera, també el nombre i la qualitat de les seves publicacions científiques en revistes de l'especialitat amb elevat factor d'impacte (llibres, 80 capítols de llibre i 150 articles en revistes científiques) es corresponen amb la seva alta vàlua acadèmica, professional i investigadora, i l'avalen com a persona que reuneix mèrits per ser acadèmic d'aquesta corporació.

Com a bon científic i persona compromesa amb la societat, també ha dedicat part del seu temps i dels seus coneixements a tasques de divulgació i d'elaboració de guies per a l'exercici professional.

Va ser president de la Societat Catalana de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica durant els anys 1999 i 2000, i és el president i organitzador del Congrés de la Societat Espanyola de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica que es farà el proper mes maig.

Ha participat en diversos grups d'experts, entre els quals voldria destacar, per la relació amb el tema del seu discurs d'ingrés, el Grup Espanyol de Grip del Consell Interterritorial del Sistema Nacional de Salut, el Comitè d'Experts en Infeccions Víriques Respiratòries del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya i el Comitè d'Experts del Ministeri de Sanitat per a l'elaboració del Pla nacional de preparació i resposta enfront d'una pandèmia de grip.

Des de l'any 2006, any en què es va constituir, és president del Consell Científic Assessor del Pla d'actuació a Catalunya enfront d'una possible pandèmia de grip. Aquesta tasca, per raons de l'emergència el passat mes d'abril d'un nou subtipus de virus A amb capacitat de transmetre's entre humans, l'anomenat virus pandèmic (H1N1) 2009, li ha ocupat una gran part de la seva activitat en els darrers mesos i per això els professionals sanitaris li hem d'agrair la seva implicació i dedicació.

Per acabar vull felicitar molt efusivament el nou acadèmic, i també la seva esposa, els seus fills, i la seva mare, i demanar al nostre president que li cedeixi l'ús de la paraula perquè ens llegeixi el seu discurs d'ingrés.

Moltes gràcies

## **AGRAÏMENTS**

***Excel·lentíssim senyor president,  
Molt Il·lustres senyores i senyors acadèmics,  
senyores y senyors,  
estimats amics i familiars***

Primer vull expressar la meva satisfacció i el meu profund agraïment a la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya i especialment als Molt Il·lustres Acadèmics, doctors Àngela Domínguez García, Fèlix Pumarola Busquets i Josep Ribas Sala, per haver-me proposat com a nou acadèmic corresponent. Voldria, de nou, donar moltes gràcies a la Molt Il·lustre Professora Àngela Domínguez García per les seves amables paraules de presentació. Amb ella he mantingut una estreta col·laboració professional en els darrers anys, havent estat una inesgotable font de coneixement i un exemple constant de capacitat de treball.

És per a mi un gran honor, i un motiu d'orgull, poder ser membre d'aquesta prestigiosa corporació. Espero poder complir dignament les responsabilitats que implica aquest nomenament.

L'èxit a la vida professional d'una persona està directament relacionat a la qualitat dels mestres que han modelat el seu treball des de l'inici. Jo he tingut la sort de tenir dos mestres excel·lents. En primer lloc el meu pare, el Molt Il·lustre Professor Agustí Pumarola Busquets, que amb les dues vessants de pare i mestre va ser determinant en el meu desenvolupament personal i vocacional. No és casualitat que avui parli de grip, tema que va constituir el seu discurs d'ingrés a la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya l'any 1971. En segon lloc la Professora Maria Teresa Jiménez de Anta Losada, que amb el seva constant direcció i suport, basada en una gran estimació envers els meus pares i la meva persona, a fet que el camí recorregut hagi estat molt planer.

A més, avui m'agradaria compartir la satisfacció personal i professional del moment amb totes aquelles persones que, d'una manera o d'una altra, han fet possible el camí que m'ha dut fins aquí. Després de 28 anys de professió, són molts. A tots ells el meu més sincer agraïment per la seva ajuda i pacient col·laboració. Però no vull deixar de fer esment especial en els companys i

companyes del Servei de Microbiologia de l'Hospital Clínic. Ja són molts anys de treball conjunt, amb moments bons i d'altres no tan bons, però sempre superant les dificultats gràcies a l'esforç de conjunt i amb un esperit positiu i lluitador, fugin dels protagonismes personals. Moltes gràcies a tots.

També vull agrair a tota la meva família, especialment a la meva mare, l'amor, el recolzament i la comprensió que han demostrat al llarg de les diferents etapes de la meva vida

Finalment, en aquest capítol d'agraïments, ha d'ocupar sens dubte un lloc preferent la meva esposa, Mercè, sense la qual aquest acte mai no hauria pogut tenir lloc. I també els meus fills Albert i Jordi, mereixen un esment especial. He de reconèixer que tots ells han demostrat una immensa generositat envers la meva, de vegades excessiva, dedicació professional. Amb ells sempre he trobat l'estímul i el suport necessaris per anar endavant.

## ÍNDEX

<b>A.</b>	Introducció	10
<b>B.</b>	Record històric	11
<b>C.</b>	Les pandèmies del segle xx	12
<b>D.</b>	Els virus de la grip	13
<b>D.1.</b>	L'hemaglutinina i la neuraminidasa	14
<b>D.2.</b>	Variabilitat genètica	16
	Variacions majors	
	Variacions menors	
<b>E.</b>	L'evolució viral i les mesures de control virològic	18
<b>E.1.</b>	Vigilància virològica	19
	Factors de predicció	
	Evolució en el reservori	
	Especificitat d'espècie i transmissió	
	Altres factors de patogenicitat	
	Circulació mundial	
<b>E.2.</b>	Antivirals	27
	Resistències als antivirals	
<b>E.3.</b>	Vacunes	32
<b>F.</b>	Virus potencialment pandèmics i pandèmics del segle XXI	33
<b>F.1.</b>	Virus de la grip A aviària (H5N1)	33
<b>F.2.</b>	Virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009	36
<b>G.</b>	Conclusions	42
	Bibliografia	44



**“Policy decisions regarding influenza rest on judgments about the behaviour of the virus, the impact of the disease and our ability to interdict its course. But the virus is capricious, the disease elusive, and our remedies imperfect”**

Extret d'un informe a propòsit del brot de grip A porcina (H1N1) a Fort Dix (EUA) l'any 1976 (<http://www.iom.edu/?id=65926>)

## A. Introducció

La grip és una vella malaltia que causa epidèmies anuals i a intervals irregulars pandèmies.

La grip continua sent un important problema de salut pública, com a conseqüència de les altes taxes de morbiditat que produeix durant les ones epidèmiques anuals i la presència de complicacions i sobremortalitat en grups específics de població (1). L'increment de les taxes de consulta i hospitalització, juntament amb el nombre de dies de treball perduts per la malaltia, suposen costos directes i indirectes elevats per a la societat. Però el que causa preocupació, donada la gran capacitat de propagació dels virus de la grip, és la possibilitat sempre latent d'una pandèmia, fet que s'ha repetit fins tres vegades en el segle passat.

En una ona epidèmica normal, de les que succeeixen cada període hivernal, s'estima que entre un 5-20% de la població arriba a emmalaltir de grip. No obstant això, durant una pandèmia aquestes xifres es poden elevar per sobre del 30% i arribar a la meitat de la població d'una comunitat (2). El 15 d'abril d'aquest any es va identificar un virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009 de llinatge porcí a les mostres de dos pacients epidemiològicament associats dels Estats Units d'Amèrica (EUA). La mateixa soca viral es va identificar a Mèxic i Canadà. Des de llavors el virus s'ha estès a tot el món (3) (25/06/09). L'Organització Mundial de la Salut (OMS) va decidir l'11 de juny passar a fase 6 de pandèmia (3).

Durant les quatre setmanes següents a la descripció del primer cas als EUA, el virus es va difondre a 41 països i va ser causa de 11.034 casos de grip amb 85 morts, la majoria a Mèxic (3). En comparació, 80.000 nens moren de malària i el doble d'infeccions gastrointestinals durant un període de quatre setmanes a tot el món (4). Per què s'ha creat aquesta alarma tan important?

L'alarma sanitària en els brots epidèmics de grip s'origina arran de la història de les tres pandèmies del segle xx. De fet, els virus de la grip posseeixen el potencial de trobar-se entre els virus amb major virulència. Durant la pandèmia de 1918, en un període de quatre setmanes van morir 4.000.000 de persones com a conseqüència de la grip o de pneumònia bacteriana secundària a la infecció gripal. Això és aproximadament el doble de

les morts per SIDA a tot el món durant l'any 2007. També a escala mundial i durant un període de quatre setmanes es van produir 150.000 i 80.000 morts en les pandèmies dels anys 1957 i 1968 respectivament.

Addicionalment, un virus de la grip A aviària (H5N1) de gran patogenicitat ha circulat durant l'última dècada pel Sud-est asiàtic i s'ha propagat a més de 60 països. A 2 de juny de 2009 s'han confirmat 433 casos d'infecció humana, dels quals 262 han estat mortals (5). La transmissió directa del virus als éssers humans, encara que ocasional, i la seva letalitat, suggereixen la possibilitat d'una pandèmia semblant a la grip espanyola de 1918, si el virus adquireix la capacitat de transmissió interhumana.

La història de la grip sempre ha posat de manifest que les soques pandèmiques o amb potencial pandèmic no es comporten de la mateixa manera i que els virus de la grip són patògens en constant evolució, de tal manera que, ara com ara, som absolutament incapaços de predir a on apareixeran i com canviaran en el futur.

Encara que entenem els mecanismes generals pels quals sorgeixen nous virus de la grip, el nostre coneixement bàsic de com adquireixen potencial pandèmic és mínim, i la nostra comprensió molecular del virus i dels factors de l'hoste implicats en l'eficiència de la transmissió i la propagació és rudimentària. Aprofundir en l'estudi de l'ecologia del virus de la grip i en els aspectes moleculars de la patogènia i la transmissió permetrà el desenvolupament de marcadors de predicció de la grip pandèmica i estacional i, per tant, modular els nivells de preparació per fer-hi front.

## **B. Record històric**

Podríem dir que la història de la grip s'inicia l'any 1930 quan Richard Shope aïlla el virus de la grip porcina per primer cop (6). Però són abundants les descripcions clíniques i epidemiològiques que permeten identificar la malaltia molt abans del segle xx.

És molt difícil assenyalar amb precisió l'època en què apareixen els primers brots de grip, i no existeix acord entre els diferents historiadors. Potser la referència més antiga d'una epidèmia de tipus gripal es deu a Hipòcrates i Titus Livi, que descriuen un extens brot d'una afecció catarral l'any 412 aC.

Existeixen clares descripcions que permeten suposar que a Europa es van produir almenys trenta-vuit epidèmies importants entre els segles XII i XVIII.

El terme *influenza* és la forma italiana del llatí *influentia*, i es va utilitzar en el segle XV per designar epidèmies atribuïdes a la influència dels estels i dels planetes. Els autors anglesos van incorporar aquesta terminologia (*influenza*) en el segle XVIII. Al mateix temps, els autors francesos van preferir el nom de *grippe*, del qual deriva el nom en castellà, amb clara referència al component catarral de la malaltia.

En el segle XIX, les dades clíniques i epidemiològiques són ja molt completes i asseguren que la grip va mostrar una important activitat epidèmica en 16 ocasions entre 1800 i 1875. El 1889 va tenir lloc una gran pandèmia causada per un virus de la grip A (H3N8) (7).

### **C. Les pandèmies del segle XX**

En el segle passat es van produir tres pandèmies (8, 9).

*La grip espanyola (1918-1919)* (produïda pel virus de la grip A (H1N1)): La pitjor pandèmia en la història de les malalties infeccioses. El seu origen geogràfic és dubtós, però ha quedat prou demostrat que no va ser originari d'Espanya. El nom li va atorgar la premsa internacional de l'època, probablement per les primeres notícies aparegudes en la premsa espanyola, no sotmesa a la censura derivada de la I Guerra Mundial (9, 10). En un període de dotze mesos va afectar (en tres onades) a un 30-50% de la població mundial i va causar una xifra d'almenys 50 milions de morts (probablement la mortalitat va arribar fins als 75-100 milions, sobre una població mundial d'uns 1.200-1.400 milions de persones). La malaltia va tenir especial gravetat i mortalitat en el grup de població d'entre quinze i quaranta-cinc anys d'edat, a diferència del que sol ser més habitual (nens molt petits i persones de més de seixanta-cinc anys d'edat). A Espanya va causar oficialment entre 160.000 i 170.000 morts (sobre un total de 20.000.000 d'habitants), però és probable que la xifra total de morts relacionada amb la pandèmia gripal se situés al voltant dels 250.000–260.000.

*La grip asiàtica (1957-1958)* (produïda pel virus de la grip A (H2N2)): La pandèmia es va originar a l'Àsia i va seguir un patró més «clàssic»; els grups

de més gravetat i més incidència de malaltia van ser els nens i les persones de més edat i amb malalties de base greus (7-9). El virus va desaparèixer onze anys després. Es va poder emprar una vacuna parcialment eficaç en alguns països d'Europa i als EUA, i es van poder tractar amb més facilitat (antibiòtics) algunes de les complicacions bacterianes associades a la grip. La mortalitat global s'estima en uns 3 a 5 milions de persones.

*La grip de Hong Kong (1968-1969)* (produïda pel virus de la grip A (H3N2)): També originada a l'Àsia (11). El patró epidèmic a Europa va ser notablement diferent del de les altres dues pandèmies (12, 13). Es va enregistrar un augment notable de casos de grip, però la mortalitat no va augmentar (i ho va fer només lleugerament) fins al final de la pandèmia, fet que es va atribuir en part a l'existència d'un cert grau d'immunitat residual creuada. La mortalitat global es va xifrar en 1-1,5 milions de persones, la majoria a l'Àsia i als EUA. El virus H3N2 persisteix hores d'ara entre nosaltres.

#### **D. Els virus de la grip**

Els virus de la grip pertanyen a la família *Orthomyxoviridae* i està composta per quatre gèneres: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* i *Thogotovirus* (14). El nom de *mixovirus* deriva de la seva afinitat per la mucina, mucoproteïna present en el moc de les secrecions, en sèrum sanguini i en receptors existents a la membrana dels hematies i alguns teixits epitelials. La grip humana està causada fonamentalment pels virus de la grip A i B.

L'espectre de reservoris vírics tindrà implicacions importants en l'epidemiologia de la grip. Si bé el virus de la grip B ha estat responsable d'epidèmies greus, la incidència de casos pel virus de la grip A és superior en els brots epidèmics anuals i determinant en relació amb les pandèmies. Això és degut al seu particular espectre de reservoris. Mentre que el virus de la grip B infecta de forma exclusiva a l'home, el virus de la grip A és un virus fonamentalment aviari que es replica asimptomàticament en l'intestí i en el tracte respiratori d'aus aquàtiques, particularment ànecs, que constitueixen un important reservori de virus potencialment pandèmics (15, 16) que es transmeten periòdicament a altres espècies, incloent els mamífers.

Al llarg d'aquest discurs tan sols em referiré als virus de la grip A per la seva importància com a causants de pandèmies.

Els virus de la grip són virus amb ARN monocatenari, de polaritat negativa i segmentat (14). La partícula vírica completa té una mida mitjana (50-120 nm de diàmetre), és de simetria helicoïdal i presenta com a capa més externa un embolcall lipídic que deriva de la membrana citoplasmàtica de la cèl·lula hoste. A l'embolcall es troben presents dues glicoproteïnes de codificació viral de cabdal importància en la patogènia de la grip, l'hemaglutinina (HA) i la neuraminidasa (NA) (figura 1).

La membrana lipídica condiona que els virus de la grip siguin molt sensibles a l'èter i als agents externs. La seva escassa resistència dins del medi ambient i la seva via d'eliminació per secrecions respiratòries, expliquen la transmissió de la grip per mecanisme directe a través de gotes i contacte (7, 17).

La informació genètica dels virus de la grip està continguda en l'ARN (18, 19), que té una característica única i específica dels ortomixovirus, la de trobar-se segmentat. La majoria dels segments codifiquen una única proteïna, encara que hi ha excepcions. El virus de la grip A té vuit segments que codifiquen fins a deu proteïnes (taula 1), vuit formen part de l'estructura del virus i es denominen *proteïnes estructurals*, mentre que les restants apareixen exclusivament durant la replicació intracel·lular del virus i es denominen *proteïnes no estructurals* (NS).

#### **D.1. L'hemaglutinina (HA) i la neuraminidasa (NA)**

Entre els diferents components estructurals dels virus de la grip, les glicoproteïnes de superfície, l'HA i la NA, presents a l'embolcall viral, tenen un gran interès en la història natural de la infecció per aquests virus. La HA deu el seu nom a la capacitat del virus per aglutinar hematies mitjançant la unió a receptors específics d'àcid siàlic presents en la membrana cel·lular. L'HA és el component glicoproteic més important i constitueix al voltant del 25% de les proteïnes del virus (14, 20). És responsable de l'adsorció a la cèl·lula diana, mitjançant la fixació als receptors d'àcid siàlic de les cèl·lules de l'epiteli

respiratori, primer pas necessari per a la penetració i replicació del virus en l'interior cel·lular.

Perquè la HA sigui biològicament activa ha de ser processada proteolíticament, i generar dues subunitats polipeptídiques unides per ponts disulfur. La subunitat H2 és la que s'unirà al receptor cel·lular. Amb excepció de les denominades HA de gran patogenicitat, l'activació enzimàtica es produeix per proteases presents tan sols al tracte respiratori, fonamentalment la tripsina, fet que limita la lesió cel·lular en aquesta àrea del nostre organisme, ja que l'àcid siàlic es troba a la superfície de pràcticament totes les cèl·lules de l'organisme humà.

La neuraminidasa (NA) representa al voltant del 5% de les proteïnes totals del virió, que conté aproximadament una projecció glicoproteica de NA per cada 7-8 d'HA (14); cada virió posseeix al voltant de cinquanta molècules de NA. Gràcies a la seva activitat sialidasa participa en l'alliberament de les noves partícules víriques de la cèl·lula diana, en impedir la seva agregació a la superfície cel·lular. Addicionalment facilita la difusió dels virions a través de la mucina de l'epiteli respiratori. Actualment és una important diana d'antivírics, els anomenats inhibidors de la neuraminidasa (oseltamivir i zanamivir).

L'HA indueix la producció d'anticossos que neutralitzen la infectivitat vírica en impedir la seva unió als receptors cel·lulars, sent de gran importància en la immunitat protectora enfront de la grip. Si bé els anticossos enfront de la NA no neutralitzen la infectivitat del virus, tenen un important paper en la reducció de la difusió viral a l'epiteli respiratori (21).

El virus de la grip A es classifica en subtipus basant-se en els antígens de l'HA i la NA (14). S'han descrit un total de setze HA i nou NA per al virus de la grip A al seu reservori aviari. Tot i una extensa vigilància del virus de la grip A en l'home i els animals, només s'ha descrit una nova HA en els darrers onze anys, indicant probablement que el nombre d'HA i NA en la natura és limitat. Que tinguem constància, únicament tres HA (H1, H2 i H3) i tres NA (N1, N 2 i N8) s'han associat a infecció establerta en l'home, causada per quatre subtipus de virus de la grip A: H3N8, H1N1, H2N2, H3N2 i H1N2.

La resposta immunitària de tipus humoral induïda per l'HA i la NA del virus de la grip A és exclusivament específica de subtipus.

La denominació dels virus de la grip inclou el tipus (A o B), el subtipus antigènic (HA i NA només per al virus de la grip A) i el lloc, número i any del seu aïllament. Així, la soca A/New Caledonia/20/99 (H1N1) significa que és un virus de tipus A, subtipus H1N1, aïllat a Nova Caledònia l'any 1999 i que correspon a la soca núm. 20 aïllada aquest any. Addicionalment, en els virus d'origen animal s'especifica l'hoste (A/chicken/Hongkong/156/97 (H5N1)).

## **D.2. Variabilitat genètica**

Les pandèmies i els brots epidèmics anuals de grip es produeixen com a conseqüència de la important variabilitat genètica dels virus de la grip, que tot i afectar la totalitat dels gens virals, quan les variacions tenen lloc a l'HA tindran una rellevància cabdal, doncs l'HA és la principal inductora de la resposta immunitària protectora.

La gravetat d'una epidèmia o pandèmia és proporcional al grau de susceptibilitat de la població, que a la vegada està directament relacionat amb el grau de canvi de les glicoproteïnes de superfície del virus, l'HA i la NA. Com més gran és el canvi en aquestes glicoproteïnes, més petita és la capacitat de neutralització dels anticossos humans i, per tant, també serà menor el nivell d'immunitat poblacional. Canvis menors en aquests antigens són els responsables dels brots epidèmics anuals, mentre que canvis majors, entesos com la substitució completa de l'HA i/o la NA, són els responsables de les pandèmies.

## **Variacions majors**

La grip pandèmica es pot produir com a conseqüència de variacions majors o substitucions antigèniques, que impliquen l'aparició d'un nou subtipus de virus de la grip A amb una HA i, en ocasions, una NA diferents al virus difós fins aleshores en la població, davant del qual aquesta manca totalment d'experiència immunològica. Les variacions majors es produeixen per un fenomen de reagrupament genètic entre soques humanes i animals, facilitat per l'existència d'un àcid nucleic segmentat, que permet l'intercanvi de segments entre virus en aquelles situacions en què una mateixa cèl·lula sigui infectada



per dos subtipus diferents del virus de la grip A. No s'han descrit fenòmens de reagrupament genètic entre els virus de la grip A i B.

S'ha demostrat que el reagrupament genètic té lloc de forma espontània a la natura. Els virus causants de les pandèmies de grip asiàtica (1957) i grip Hong Kong (1968) van ser el resultat de reagrupacions genètiques entre els genomes dels virus prèviament circulants i virus aviaris (22). Així, el subtipus H2N2 (1957) va mantenir cinc segments del subtipus H1N1 precedent, que al seu torn va adquirir tres segments (H2, N2 i PB1) procedents d'un virus aviari. Posteriorment, l'adquisició de la HA aviària H3 i del segment PB1 pel virus H2N2, va donar lloc a una nova soca pandèmica H3N2 (1968) (22).

Els nous subtipus que van emergir el 1957 i el 1968 van reemplaçar els subtipus precedents. El virus H1N1 va reaparèixer el 1977 (grip russa) i no va substituir el subtipus precedent H3N2. De fet, aquesta nova introducció no es va considerar com una pandèmia. El nombre de casos va ser molt baix, a conseqüència de la gran proporció de població amb immunitat protectora enfront d'aquest virus, que ja havia circulat amb anterioritat a l'any 1957. És a dir, actualment dos virus de la grip A (H1N1 i H3N2) es troben circulant conjuntament amb el virus de la grip B des de 1977, de manera que la vacuna anual enfront de la grip és trivalent, ja que conté soques representatives de cadascun dels subtipus del virus de la grip A (H3N2 i H1N1) i del virus de la grip B circulants en la població.

La circulació conjunta dels dos subtipus del virus de la grip A podria resultar en l'emergència de subtipus amb diferents combinacions d'HA i NA. Durant 1988 i 1989 va circular a la Xina un virus de la grip A (H1N2), degut a un fenomen de reagrupació genètica entre els subtipus H3N2 i H1N1, que va causar, durant la temporada 2001-2002, diversos brots epidèmics locals a Europa i Estats Units. Probablement, no ha estat causa d'una nova pandèmia en posseir la població un elevat nivell immunitari davant els determinants antigènics de la H1 i la N2.

### **Variacions menors**

És ben conegut que els virus ARN tenen una gran capacitat evolutiva i d'adaptació a pressions ambientals adverses, com la resposta immunitària o

l'activitat farmacològica. Això és conseqüència de la manca de fidelitat de les polimerases víriques encarregades de la replicació de l'àcid nucleic, juntament amb l'absència de mecanismes de correcció d'aquests errors. Els virus de la grip no són diferents, de fet la polimerasa d'aquests virus té una elevada taxa d'error, de  $1/10^4$  bases per cicle de replicació (14).

Els brots epidèmics anuals són causats per virus del mateix subtipus que presenten variacions menors, caracteritzades per l'acumulació de canvis d'aminoàcid, fonamentalment en l'HA i que dificultaran la unió dels anticossos neutralitzants. Conseqüentment, es redueix el nivell de protecció enfront de la infecció per les noves variants antigèniques. Aquestes se seleccionen en base a la pressió immunològica, a què es troben sotmesos els virus de la grip a mesura que es transmeten de persona a persona, al llarg d'un brot epidèmic. Això fa que, al llarg de l'estació epidèmica de grip, se seleccionin aquelles variants del virus més resistents en els anticossos específics presents a la població, obligant per tant a modificar la vacuna any rere any.

A més a més, estudis recents semblen demostrar que el virus de la grip A (H1N1) causant de la pandèmia de 1918 era possiblement un virus exclusivament aviari, sense components genòmics humans o d'altres mamífers (23, 24). És a dir, l'aparició de virus pandèmics també podria ser causada per un procés d'adaptació a l'organisme humà, mitjançant les variacions menors exclusivament.

En resum, la principal característica dels virus de la grip és la seva variabilitat genètica, mitjançant variacions majors o menors, que els permetrà evadir la resposta immune i ser causa de brots epidèmics anuals i, amb menys freqüència, de pandèmies de grip. Però no podem oblidar que la variabilitat genètica també és un factor determinant en altres aspectes de la patogènia dels virus de la grip, com l'especificitat d'espècie, la capacitat de transmissió o els factors de patogenicitat, tots ells també determinants, a més de la resposta immunitària, en la generació de virus pandèmics.

## **E. L'evolució viral i les mesures de control virològic**

Les mesures de control virològic de la grip es basen en tres grans àrees: la vigilància virològica, la profilaxi i el tractament amb antivirals, i, per últim, la vacunació.

La variabilitat genètica i la constant evolució dels virus de la grip és determinant en el tipus d'actuacions a dur a terme en cadascuna d'aquestes àrees.

La vigilància virològica és absolutament necessària per poder fer un seguiment de l'evolució viral i establir factors que permetin predir el desenvolupament del brots epidèmics i l'aparició de virus amb potencial pandèmic.

La cada vegada més freqüent selecció de variants del virus de la grip resistents als fàrmacs antivirals ha obligat a modificar les seves pautes d'utilització i a potenciar el desenvolupament de nous fàrmacs i de noves dianes terapèutiques.

Finalment, la variabilitat genètica també és la responsable de la necessitat constant de modificar la composició de la vacuna, que fa necessari el desenvolupament de noves vacunes amb nous sistemes de producció i amb capacitat per induir una resposta protectora d'ampli espectre i no exclusivament subtipus-específica com l'actual.

### **E.1. Vigilància virològica**

El reconeixement de la variabilitat antigènica viral, després de l'aïllament del primer virus de la grip humana (6), va portar a l'Organització Mundial de la Salut (OMS) a l'establiment d'una xarxa internacional de laboratoris per a la vigilància epidemiològica dels virus de la grip (Global Influenza Surveillance Network, GISN), que actualment cobreix noranta-sis països, a través de la col·laboració de cent vint-i-cinc centres nacionals de grip i quatre grans centres de referència (EUA, UK, Austràlia i Japó) (25). A Espanya hi ha tres Centres Nacionals de Grip: el Centre Nacional de Microbiologia de l'Institut de Salut Carles III (Madrid); el Departament de Microbiologia de la Universitat de Valladolid i el Departament de Microbiologia de l'Hospital Clínic. La xarxa té dos grans objectius: a) la detecció precoç i la caracterització dels nous subtipus del virus de la grip A amb potencial per causar pandèmies, com en els recents

casos de grip per H5N1 (1997) (26) i H9N2 (1999) a Hong Kong i per H7N7 a Holanda i Bèlgica (2003) (27) i b) la identificació de variants antigèniques noves entre els virus de la grip A i B en circulació, per a la producció anual de la vacuna contra la grip. L'OMS ha publicat recomanacions per a la composició de les vacunes de grip des de l'any 1973. A partir de 1998, fa dues recomanacions anuals al febrer i al setembre per a les vacunes que cal utilitzar durant els mesos d'hivern en els hemisferis Nord i Sud respectivament.

A Catalunya, la vigilància epidemiològica de la grip es va iniciar a la temporada 1988-1989 i es va modificar a partir de 1999-2000 amb la posada en marxa del Pla d'Informació Diària de les Infeccions Respiratòries Agudes a Catalunya (PIDIRAC), coordinat pel Servei de Vigilància Epidemiològica de la Direcció General de Salut Pública (DGSP) i que inclou un programa de vigilància virològica en col·laboració amb el Laboratori de Microbiologia de l'Hospital Clínic de Barcelona (Centre Nacional de Grip de l'OMS) (28, 29).

Aquestes xarxes de vigilància epidemiològica i virològica, presents a cada regió europea, proporcionen informació clínica i virològica que setmanalment s'envia al Sistema de Vigilància de la Grip a Europa (30) (European Influenza Surveillance Scheme. EISS / European Center for Diseases Control. ECDC), possibilitant una ràpida difusió de resultats i recomanacions per tal d'adoptar les mesures oportunes de control durant els brots epidèmics anuals de grip.

Arran del brot de grip aviària en el Sud-est asiàtic i davant de la circulació d'un virus amb un important potencial pandèmic (virus de la grip A aviària (H5N1)) l'OMS va recomanar que els Centres Nacionals de Grip, a banda de participar activament en el anomenats Plans Pandèmics de Preparació enfront d'una Pandèmia de Grip, fessin un seguiment acurat de l'evolució dels virus de la grip a la població, fent èmfasi en aquells factors virals que determinen l'especificitat d'espècie, la capacitat de transmissió, la virulència, les resistències als antivirals i l'eficàcia vacunal.

## **Factors de predicció**

Tot i conèixer els mecanismes generals responsables de l'emergència de nous virus de la grip, el moment, el lloc d'aparició, els mecanismes

d'adquisició del potencial pandèmic i les característiques patogèniques de les noves variants virals són impossibles de predir, en gran mesura pel nostre limitat coneixement dels aspectes més bàsics de la biologia dels virus de la grip.

És necessari aprofundir en tots aquells aspectes que probablement siguin determinants: l'evolució viral en el reservori, els factors del virus i de l'hoste implicats en l'especificitat d'espècie, la capacitat de transmissió i difusió viral i els factors de patogenicitat. És evident que el coneixement de tots aquests aspectes de l'ecologia i la patogènia dels virus de la grip permetrà el desenvolupament futur de factors de predicció de la grip estacional i pandèmica i, per tant, millorar els nivells de preparació enfront de la grip.

Com per exemple el virus de la grip espanyola. Tot i que retrospectivament, avui coneixem que presentava fins a deu mutacions d'adaptació a l'organisme humà (23, 24); no existia una seqüència polibàsica en el lloc d'hidròlisi de l'HA, característic de les HA de gran patogenicitat (24) (veure més endavant); indueix una resposta immunitària anòmala en el ratolí (31) i en els primats (32), tret que comparteix amb el virus de la grip A aviària (H5N1) (33), i que és responsable, en gran mesura, de la seva patogenicitat i mortalitat en humans; l'HA (34-36), la polimerasa (37-39) i les proteïnes NS1 (40) i PB1-F2 (41) hi contribueixen activament en el seu poder patogen; i finalment que l'HA i la proteïna PB2 van ser crítiques per la seva capacitat de transmissió (39).

En el supòsit d'haver disposat de tota aquesta informació de forma prospectiva, mitjançant una vigilància virològica activa dels virus de la grip circulants a la població humana i animal els anys previs a 1918, hauríem tingut la capacitat de predir la pandèmia? I, per tant, adoptar les mesures necessàries per evitar-la o bé pal·liar-ne els efectes?

### *Evolució en el reservori*

Les setze HA i les nou NA que formen els diferents subtipus del VGA es perpetuen en les aus aquàtiques, en les quals no són causa de malaltia aparent (42) i que constitueixen el seu reservori natural. Tan sols els virus de la grip A amb subtipus H5 i H7 poden passar a ser de gran patogenicitat, després de la

incorporació d'una seqüència polibàsica en el lloc d'escissió enzimàtica de l'HA i ser causa d'una gran mortalitat en les aus de corral. Tots aquests virus sempre s'han originat a partir de precursors de baixa patogenicitat presents en el reservori aviari (43). Clàssicament, les HA de gran patogenicitat sempre han estat ràpidament eradicades i no han persistit en la natura. La circulació continuada des de 1997 d'un virus de la grip A aviària (H5N1) de gran patogenicitat, causa d'un important brot epidèmic al Sud-est asiàtic en les aus de corral i de casos esporàdics en humans, és un fet sense precedents.

L'evidència acumulada suggereix que tots els virus de la grip que van ser causa de pandèmia al segle XX es van originar a partir del reservori aviari, bé per reagrupament genètic (H2N2 i H3N2) o bé per adaptació directa a través de mutació simple (H1N1) (34).

Tenim un coneixement molt limitat de l'evolució genètica en el reservori dels virus precursors de pandèmies i de panzooties. La informació disponible indica que en seu reservori natural, els virus tenen una evolució molt limitada, es multipliquen principalment al tracte respiratori i intestinal, en el cas de les aus, i canvien els subtipus predominants cada dos anys (15), d'acord amb l'existència de fenòmens continus de reagrupació genètica (44, 45).

En l'actualitat, no existeix un sistema de vigilància epidemiològica i virològica, en l'àmbit animal (15), comparable a la ben organitzada i interactiva Global Influenza Surveillance Network (GISN) de l'OMS establerta per la grip humana. Fins que això no sigui possible no podrem disposar d'una llibreria de tots els subtipus de virus de la grip presents en les aus salvatges i domèstiques, la qual cosa és de vital importància per a l'establiment de factors de predicció.

### *Especificitat d'espècie i transmissió*

Els virus de la grip necessiten determinats canvis genètics per difondre's del reservori a altres hostes. Aquests canvis es veuen facilitats quan diferents espècies d'aus i mamífers conviuen en proximitat (46), com passa a les zones rurals i mercats d'animals vius dels països asiàtics. Desconeixem si aquesta transmissió és directa. De fet, fins i tot els pollastres no són susceptibles als virus H5 i H7 de baixa patogenicitat sense un mecanisme previ d'adaptació

(47). La participació d'hostes intermedis com el porc ha estat suggerida (48). La informació sobre quines són les molècules que permeten la transmissió entre les espècies és encara molt incipient (49-51).

Diversos factors genètics han demostrat ser determinants en l'especificitat d'espècie en situacions experimentals, però encara es té un limitat coneixement de la combinació de factors necessaris per a restringir o facilitar la transmissió interespècie. El reagrupament genètic té un important paper en aquest sentit.

En la patogènia general dels virus, les estructures virals d'unió en els receptors cel·lulars solen ser determinants en l'especificitat d'espècie. En el cas dels virus de la grip seria l'HA. L'HA dels virus de la grip humana s'uneix preferentment a receptors, presents en la superfície de la cèl·lula, que contenen àcid siàlic amb una unió a galactosa a través d'un enllaç de tipus alfa 2,6 (SA $\alpha$ 2,6Gal), absent en les aus (52). Per contra, els virus aviaris posseeixen tropisme per receptors d'àcid siàlic amb enllaços de tipus alfa 2,3 a galactosa (SA $\alpha$ 2,3Gal) (53, 54), que en principi es creien absents en les cèl·lules epitelials humanes. La tràquea del porc posseeix ambdós tipus de receptors, raó per la qual podria ser infectat tant per soques humanes com aviàries.

S'ha proposat que el reagrupament genètic entre soques aviàries i humanes tindria lloc en el porc, que constituiria un autèntic «tub d'assaig» per a la creació i posterior difusió de soques amb potencial pandèmic (55). Aquesta hipòtesi vindria recolzada per la descripció de brots, en poblacions de porcs, per virus aviaris (56) i per l'existència de transmissions esporàdiques de virus entre el porc i l'home en tots dos sentits (57, 58).

Per tant, en el porc es podria donar el cas de l'aparició d'un nou virus reagrupat amb l'HA aviària i la resta de segments del genoma fonamentalment humans, la qual cosa li permetria infectar i transmetre's interhumanament. Però abans, seria necessari que l'HA aviària modificués el seu tropisme pels receptors humans d'àcid siàlic. En aquest sentit s'han identificat canvis específics d'aminoàcid en l'HA, de gran importància en l'especificitat del receptor i en la patogènia (48, 59-61).

Els virus pandèmics de 1918, 1957 i 1968 tenien tropisme pels receptors alfa 2, 6 (59), indicant que l'afinitat per aquest receptor seria necessària perquè

un virus amb una HA d'origen aviari pugui generar una pandèmia. Però desconeixem si aïlladament aquest canvi per l'especificitat del receptor és suficient per generar virus pandèmics. És sorprenent com els virus de la grip A aviària (H5N1) del Sud-est asiàtic, tot i unir-se exclusivament a receptors de tipus alfa 2, 3 (48), han travessat la barrera d'espècie causant infeccions en els humans amb una gran mortalitat, encara que sense capacitat de transmissió interhumana. En els aïllats del virus de la grip A aviària (H5N1) obtinguts a partir de casos humans, s'han identificat mutacions en el gen de l'HA relacionades amb el reconeixement del receptor humà (61-63), indicant, per tant, l'existència d'un fenomen d'adaptació a l'organisme humà.

Estudis recents demostren la presència d'ambdós tipus de receptors en el tracte respiratori humà, encara que amb diferent distribució. Mentre que els receptors alfa 2,6 es troben presents fonamentalment en el tracte respiratori superior, s'han detectat receptors alfa 2,3 en escassa proporció en el tracte respiratori inferior, fonamentalment a nivell alveolar i bronquiolar (64-66). Això podria explicar, en part, diferents aspectes de la infecció humana pel virus de la grip A aviària (H5N1): com la dificultat de la infecció, els virus de la grip es transmeten per gota grossa amb un diàmetre superior a 5 µm i que difícilment pot arribar fins l'alvèol; la gravetat del quadre clínic, pneumònia amb tendència en el destret (*distress*) respiratori; i la dificultat de transmissió, que es produeix mitjançant les secrecions del tracte respiratori superior. Estudis *in vitro* demostren que el virus de la grip A aviària (H5N1) també es pot multiplicar en cèl·lules epitelials de la mucosa de tracte respiratori superior (67). És a dir, no es pot descartar la utilització de receptors alternatius.

A banda de l'especificitat d'espècie, la capacitat de transmissió interespecie és fonamental. Per tant, a més del tropisme per receptors hi han d'estar presents altres factors (59, 67). Un d'aquests podria ser la capacitat replicativa del virus. Determinades mutacions en el complex de la polimerasa, responsable de la replicació de l'àcid nucleic, són suficients perquè el virus adquireixi letalitat en l'animal d'experimentació. És el cas de la presència d'una lisina (Lys) en la posició 627 del gen que codifica la proteïna PB2, que forma part de la polimerasa viral (68,69). Aquesta mutació ha demostrat incrementar la capacitat replicativa dels virus de la grip A aviària (H5N1) en el tracte respiratori superior del ratolí (68); es trobava present en el virus de 1918 i en el



H5N1 que va ser causa d'un brot de gran letalitat en tigris i lleopards d'un zoo de Tailàndia l'any 2004, i en el qual es va poder demostrar l'existència de transmissió horitzontal entre els animals (70).

La majoria de virus de la grip humana tenen una lisina en aquesta posició 627 (PB2-Lys 627). Pel contrari, la majoria de virus aviaris presenten un àcid glutàmic (PB2-Glu 627). És a dir, la presència de PB2-Lys 627 està considerada com un determinant de patogenicitat viral en els mamífers, ja que tan sols aquestes variants tenen capacitat de multiplicar-se en el seu tracte respiratori superior (71). Això es pot explicar perquè la PB2-Lys 627 permet una replicació eficient a 33°C (la temperatura de la mucosa nasal) i no la PB2-Glu 627 (72), mentre que les dues variants permeten una replicació eficient a 37°C. En resum, els virus portadors de la PB2-Lys 627 es poden multiplicar obertament tant a tracte respiratori inferior com superior, la qual cosa afavoreix extraordinàriament l'eficàcia de la transmissió interespecie (73).

La substitució d'un àcid aspàrtic per una asparagina a la posició 701 de la PB2 (Asp701Asn) també ha demostrat ser un factor de patogenicitat (74, 75). L'actual virus pandèmic de la grip A pandèmica (H1N1) 2009 presenta el perfil de baixa patogenicitat en els aminoàcids a les posicions 627 y 701 (627Glu i 701Asp).

#### *Altres factors de patogenicitat viral*

*Escissió de l'HA.* L'HA s'ha d'activar mitjançant un procés proteolític per tal d'unir-se als receptors d'àcid siàlic a la superfície cel·lular. Els virus aviaris de baixa patogenicitat i els virus no aviaris presenten un residu únic d'arginina (Arg) en el punt d'escissió enzimàtica de la glicoproteïna, que fa que sigui processada quasi exclusivament per la tripsina, proteasa present a tracte respiratori, limitant per tant, la replicació viral en aquesta àrea del organisme. Les HA de gran patogenicitat incorporen una seqüència polibàsica en el lloc d'escissió (76), que permet que aquesta sigui activada per proteases ubiqües, com la furina o la PC6, de tal manera que el virus pot replicar-se sistèmicament i en altres territoris del nostre organisme, conferint una extraordinària gravetat en el quadre clínic, perquè, com ja ha estat comentat, la majoria de cèl·lules presenten àcid siàlic en la seva superfície. Actualment tan sols les HA dels

subtipus H5 i H7 han demostrat tenir la capacitat d'esdevenir de gran patogenicitat.

*Proteïna NS1.* Aquesta proteïna és un potent antagonista de l'interferó (77, 78) que té un important paper en la resposta immunitària innata. El canvi d'un àcid aspàrtic (Asp) per un àcid glutàmic (Glu) a la posició 92 confereix un caràcter de gran patogenicitat (79-81). La proteïna NS1 del virus de la grip A aviària (H5N1) (Asp92Glu) confereix resistència als efectes antivirals de l'interferó i s'associa amb els elevats nivells de citocines proinflamatòries (79, 82-85), relacionats amb la gran mortalitat d'aquesta infecció en humans. El virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009 presenta el perfil de baixa patogenicitat (92Asp).

*PB1-F2.* Aquesta proteïna indueix un procés d'apoptosi cel·lular mitjançant la interacció amb dues proteïnes mitocondrials (86, 87), potencia el fenomen inflamatori en el ratolí i incrementa la freqüència i la gravetat de les infeccions bacterianes secundàries (41). Un estudi recent ha demostrat que la substitució d'una asparagina (Asn) en la posició 66 de la PB1-F2 per una serina (Ser) (Asn66Ser) confereix un major poder patogen als virus de la grip A aviària (H5N1) en ratolins (88). Aquest fet és de gran interès, ja que el virus del 1918 presentava aquest canvi de gran patogenicitat i la seva substitució comporta l'atenuació del virus en animals d'experimentació (88).

### *Circulació mundial*

Un dels principals interrogants, a l'hora d'emetre prediccions, és l'origen dels virus de la grip estacional a cada brot epidèmic anual i quina és la seva circulació a escala mundial. Una clau, per contestar aquestes preguntes, és si les epidèmies estan causades per virus que persisteixen a baixa intensitat, un cop finalitzat el brot epidèmic anterior o si són reintroduïts des d'epidèmies que tenen lloc en altres zones del món i en aquest cas, des de quines?

Recentment, Russell CA et al. (89), mitjançant l'anàlisi antigènica i genètica de l'HA, han estudiat l'evolució de 13.000 virus de la grip humana A (H3N2), a tots els continents, entre els anys 2002 i 2007. Arriben a la conclusió que, durant aquests anys, els brots epidèmics anuals per virus de la grip A (H3N2), han estat causats per virus reintroduïts des de l'Est i Sud-est asiàtic,

on els virus circulen constantment, donada la superposició dels brots epidèmics. Les noves variants es distribuïrien en primer lloc a Oceania, Amèrica del Nord i Europa i posteriorment a Amèrica del Sud. Les importants connexions, en termes de viatge i comerç, amb les primeres, condicionarien aquesta distribució temporal. Aquests virus són finalistes, és a dir, no retornarien a les àrees d'origen. Per tant, no contribuirien a l'evolució viral a llarg termini. Dit d'una altra manera, tot allò que no passi a l'Est i Sud-est asiàtic té poc interès evolutivament parlant.

En cas d'existir una acurada vigilància epidemiològica i virològica, fent especial èmfasi sobre la seqüenciació completa del genoma i la millor comprensió de les pressions selectives que determinen l'evolució viral a l'Est i Sud-est asiàtic, podríem conèixer quin virus serà causa del proper brot estacional i, per tant, utilitzar una vacuna específica, enfront d'aquest virus, i no enfront del virus que va circular la temporada anterior, com es fa actualment. És a dir, es disminuiria substancialment la morbiditat i la mortalitat anual per grip estacional.

## **E.2. Antivirals**

Els antivirals enfront dels virus de la grip, tot i la seva esporàdica utilització per la grip epidèmica, constitueixen, conjuntament amb les anomenades mesures no farmacològiques en salut pública, l'eina més eficaç per fer front als virus pandèmics mentre no es disposa d'una vacuna eficaç (90, 91).

Aquesta opció té tres importants consideracions: a) la seva efectivitat es basa en el fet d'assumir que tinguin un 50% d'efectivitat a prevenir l'hospitalització i la mortalitat; b) s'ha d'iniciar el tractament en les primeres 48 hores del quadre clínic perquè sigui eficaç i c) hi ha d'haver una quantitat suficient d'antigripal emmagatzemada. En aquest aspecte, la majoria de països desenvolupats han dissenyat, amb gran detall, la utilització dels antivirals en els seus Plans Nacionals de Preparació enfront d'una Pandèmia de Grip (92).

Actualment existeixen dues famílies d'antigripals, els inhibidors de la proteïna M2 o adamantans (amantadina i rimantadina) i els inhibidors de la neuraminidasa (oseltamivir i zanamivir) (93).

La amantadina i la rimantadina, desenvolupades en la dècada dels 60, són amines primàries tricícliques que inhibeixen la decapsidació vírica perquè neutralitzen l'acció del canal iònic M2 a l'hora d'acidificar l'interior de la partícula vírica (94-96). La rimantadina no es comercialitza a Espanya. Aquests fàrmacs són actius enfront dels virus de la grip A humana i aviària. Aquests fàrmacs s'administren per via oral i són eficaços en el tractament de la infecció aguda pel virus de la grip A, quan s'administren durant les primeres 24 hores des de l'inici del quadre clínic, ja que redueixen la simptomatologia en un o dos dies. En dosis terapèutiques no afecten el virus de la grip B ni cap altre virus respiratori.

L'amantadina i la rimantadina han mostrat una eficàcia de pràcticament el 90% en la prevenció de la infecció pel virus de la grip A. Quan s'utilitzen com a quimioprolifàctics prevenen la malaltia però no eviten la infecció subclínica i el consegüent desenvolupament de resposta immunitària protectora al virus circulant. L'amantadina i la rimantadina no interfereixen en la resposta immunitària humoral a la vacunació.

La neuraminidasa és una glicoproteïna present a l'embolcall dels virus de la grip i que participa, gràcies a la seva activitat sialidasa, en l'alliberament de noves partícules víriques de la cèl·lula diana. Concretament, impedeix l'agregació d'aquestes partícules als receptors d'àcid siàlic de la superfície cel·lular, a més de facilitar la difusió dels virions a través de la mucina de l'epiteli respiratori. Actualment existeixen dos fàrmacs inhibidors de la neuraminidasa aprovats per a l'ús clínic: el zanamivir i l'oseltamivir (97-100). Tots dos han demostrat que són eficaços enfront de la totalitat de neuraminidases conegudes del virus de la grip A i davant del virus de la grip B. Aquests fàrmacs són eficaços en el tractament de la infecció aguda pels virus de la grip A i B, quan s'administren durant les primeres 24-48 hores des de l'inici del quadre clínic, i redueixen la simptomatologia en aproximadament dos dies.

El zanamivir és un fàrmac ben tolerat que s'administra per inhalació oral, i la pols inhalada es diposita entre un 10 i un 20% als bronquis i als pulmons i la resta a l'orofaringe. Té una biodisponibilitat baixa, només entre un 4% un 17% s'absorbeix sistèmicament, amb una vida mitjana de dues a cinc hores i s'elimina amb l'orina sense modificar-se.

L'oseltamivir s'administra per via oral com a profàrmac i s'absorbeix sistèmicament en un 80%. Les esterases hepàtiques el metabolitzen a oseltamivir carboxilat, la seva forma activa (vida mitjana 6-10 h), i s'elimina per l'orina.

Les dades de l'eficàcia dels inhibidors de la neuraminidasa en la prevenció de les complicacions greus de la grip o en els subjectes d'alt risc són molt limitades. No hi ha dades dels possibles efectes secundaris durant l'embaràs.

Els estudis realitzats en adults sans indiquen que els dos fàrmacs són efectius en la prevenció de la síndrome gripal amb confirmació de laboratori (zanamivir 84%, oseltamivir 82%). Cap dels dos inhibidors de la neuraminidasa comercialitzats ha demostrat la seva eficàcia en la quimioprofilaxi de la grip en pacients amb immunodepressió greu.

Arran del brot de Hong Kong pel virus de la grip A aviària (H5N1), la OMS va recomanar l'establiment dels anomenats Plans Pandèmics per a la Preparació enfront d'una Pandèmia de Grip (92). En el si d'aquests plans i a causa de l'afectació sistèmica i no només respiratòria present en els casos, es recomanava la utilització de l'oseltamivir en el tractament i la profilaxi de la grip pandèmica (101). A més a més, també es recomanava la creació d'estocs de fàrmac, per la impossibilitat per part de la casa comercial de poder atendre tota la demanda a escala mundial en cas de pandèmia, fet agreujat per la baixa producció del fàrmac, ja que havia estat un important fracàs econòmic per al tractament i la profilaxi de la grip estacional. Actualment, la majoria de països té un important estoc de fàrmac (10 milions de tractaments a l'Estat espanyol), que ha permès la utilització massiva de l'oseltamivir durant les fases 3, 4, 5 i 6 de la pandèmia pel virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009.

### **Resistències als antivirals**

Durant la temporada 2005-2006, es va produir un important augment del percentatge de soques del virus de la grip A (H3N2) resistents als adamantans (102), que va passar a ser del 1,9% al 14,5% (103). La temporada següent, el percentatge de soques resistents va arribar al 92,3% (104). En l'actualitat, pràcticament el 100% dels virus de la grip A (H3N2) són resistents a la

amantadina i la rimantadina. Els virus de la grip A aviària (H5N1) i de la grip A pandèmica (H1N1) 2009 també són resistents (105). Aquests virus són portadors de la mutació Ser31Asn a la proteïna M2, que confereix resistència creuada a tots dos fàrmacs. Les variants resistents no presenten una disminució de la seva eficàcia biològica i poden transmetre's de persona a persona amb gran eficiència (103).

Es va assegurar, basant-se en l'evidència científica, que aquestes xifres no es repetirien amb els inhibidors de la neuraminidasa (106,107). Aquests fàrmacs mimetitzen l'àcid siàlic, qualsevol mutació en la neuraminidasa reduiria l'afinitat pel substrat, la qual cosa invariablement resultaria en una disminució de l'eficàcia biològica viral i per tant de la seva capacitat de transmissió. Així va ser fins a la temporada 2006-2007 en què es va constatar la circulació i transmissió de virus de la grip A (H1N1) resistents a oseltamivir (108, 109).

D'acord amb aquests resultats i donada la variabilitat genètica dels virus de la grip, era d'esperar el dramàtic increment de resistències en aquest subtipus durant la temporada 2008-2009 que va arribar a ser del 98,5% dels virus circulants a tot el món (110-112). La resistència està causada per la substitució d'una histidina (His) per una tirosina (Tyr) en el codó 274 del gen de la neuraminidasa (His274Tyr), que no confereix resistència creuada al zanamivir (113). Fins al moment actual, el virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009 es manté sensible a l'oseltamivir i el zanamivir. Contràriament, han estat detectades soques resistents a l'oseltamivir en el virus de la grip A aviària (H5N1) (113,114).

És important destacar que la selecció i posterior predomini de les soques portadores de la mutació His274Tyr s'ha produït en total absència de pressió farmacològica, perquè a excepció del Japó, l'oseltamivir s'utilitzava només esporàdicament en el tractament de la grip. És a dir, es podria tractar de l'aparició totalment espontània i aleatòria d'aquesta mutació com a conseqüència de l'elevada taxa d'error de les polimerases víriques durant el cicle de replicació.

D'altra banda, si els estudis sobre la circulació mundial dels virus de la grip A (H3N2) (89), comentats anteriorment, també s'apliquen en els virus de la grip A (H1N1), la utilització, correcta o incorrecta, de l'oseltamivir fora de l'Est o el Sud-est asiàtic, no afectaria les epidèmies en aquestes àrees i, per tant,

tampoc afectaria la nova ona de disseminació global. El coneixement d'aquesta nova dinàmica dels virus de la grip ajudaria a explicar la discordança observada en la distribució de les soques resistents al llarg de la temporada de grip 2007-2008 (115). Per exemple, a Noruega, on l'oseltamivir no s'utilitza, el 67,3% de les soques eren resistents. En canvi, al Japó, país amb una ampla utilització del fàrmac, tan sols es van detectar un 3% de soques del virus de la grip A (H1N1) resistents.

Estudis recents han confirmat, contràriament al que es creia, que la presència de la mutació His274Tyr no compromet la unió al substrat, l'activitat enzimàtica, la replicació viral o la virulència en el model animal (116, 117). Perquè un virus de la grip predomini a nivell global, és necessari que tingui una eficàcia biològica superior a la resta de soques circulants. Si bé és cert que en els estudis *in vitro* la mutació His274Tyr conferia una disminució de la capacitat replicativa viral, *in vivo* es produeixen mutacions addicionals de compensació. El resultat és la creació d'una neuraminidasa biològicament superior a la de soques no portadores de la His274Tyr (115). De nou, com ja va passar amb el virus de la immunodeficiència humana (VIH), els virus ARN ens demostren la seva extraordinària capacitat d'evolució i adaptació, fins i tot en absència de pressions ambientals adverses, com en aquest cas la farmacològica.

La unió de la neuraminidasa a l'oseltamivir implica un canvi conformacional del residu d'àcid glutàmic en el codó 276 (276Glu). És important destacar que el mateix canvi conformacional no és necessari per a la unió al zanamivir. La presència d'una tirosina, que és més voluminosa que la histidina, en el codó 274 desplaça el grup carboxil d'276Glu del lloc d'unio (18). Ara bé, això no és idèntic per a tots el tipus de NA. Les neuraminidases del Grup 1 (N1, N4, N5, N8) tenen una altre tirosina per sota del lloc d'unio, en el codó 252, de tal manera que la combinació de dues tirosines (252Tyr i 274Tyr) altera el lloc d'unio a l'oseltamivir. En contrast, les neuraminidases del Grup 2 (N2, N3, N6, N7, N9) tenen una treonina, de menor volum, en el codó 252, de tal manera que en presència de la 274Tyr es manté la capacitat d'unio a l'oseltamivir (117).

D'aquests estudis estructurals es poden deduir diversos aspectes: a) la resistència a l'oseltamivir en els virus de la grip A amb neuraminidases del Grup 1 es podia predir; b) probablement, aquesta resistència no afecta les neuraminidases del Grup 2, cosa que concorda amb l'absència de resistències

en els virus de la grip A (H3N2) a l'oseltamivir; c) el zanamivir es mantindrà actiu enfront de les soques resistents a oseltamivir; d) la resistència a l'oseltamivir es pot seleccionar durant el tractament de la grip causat per altres virus amb el subtipus N1, com els virus de la grip A aviària (H5N1) o de la grip A pandèmica (H1N1) 2009, fet que pot tenir importants repercussions en els estocs d'oseltamivir i e) és necessari trobar noves dianes terapèutiques per tal de poder desenvolupar nous antivirals (118). De fet, els programés d'I+D en antigripals han passat d'estar completament aturats a tenir una activitat extraordinària, amb més de deu fàrmacs actualment en diferents fases de desenvolupament, entre els que destaquen nous inhibidors de la neuraminidasa com el peramivir (119) i el R-125489 (119) i anàlegs de nucleòsids inhibidors de la polimerasa viral com el T-705 (120), tots ells a punt d'iniciar els assajos clínics en fase III.

### **E.3. Vacunes**

La ràpida evolució dels virus de la grip és una dificultat constant en la utilització de la vacuna. D'altra banda, la vacuna, encara avui en dia, es produeix en ous embrionats de gallina. És a dir, té una producció complexa, lenta i limitada. A més a més es basa en les soques circulants en la temporada anterior a la seva administració, la qual cosa pot comportar, en ocasions, un malaparellament entre la soca vacunal i la circulant, amb la disminució de protecció de la població que això comporta.

És necessari actualitzar urgentment la tecnologia emprada en la fabricació de la vacuna, per tal d'aconseguir processos ràpids de fabricació i en grans quantitats. Aquest és un camp de recerca amb una gran activitat. La producció de virus en cultiu cel·lular i la tecnologia de la genètica reversa, mitjançant la utilització de plàsmids bacterians, permetran, en un futur proper, obtenir una vacuna de forma ràpida i per a tothom. Addicionalment, també s'ha realitzat un avenç prometedori en el desenvolupament de vacunes de vector, ADN, subunitat recombinant, peptídiques o de virioids (121).

Però, a banda dels aspectes més tecnològics, hi ha moltes preguntes sense contestar: quina estratègia vacunal indueix millor protecció (virus complets o de subunitat, utilització d'adjuvants, nombre, dosi i ruta



d'inoculació, etc.); com es pot conferir protecció creuada enfront de variants del mateix subtipus o de diferents subtipus (122); o quins són els factors que determinen l'eficàcia vacunal en els diferents grups d'edat.

Actualment, la pregunta més important és com induir protecció creuada enfront dels diferents subtipus del virus de la grip A amb una vacunació única. Les vacunes basades en proteïnes diferents a les glicoproteïnes de superfície, com les de la matriu, han obtingut resultats prometedors (123). Però més que en la generació d'anticossos neutralitzants, la solució es trobarà en la inducció d'una resposta específica de limfòcits T citotòxics enfront d'epítops conservats entre els diferents subtipus virals (124). Aquests epítops es troben en les proteïnes internes de la partícula viral, que tenen una menor capacitat de variació (125). Però encara s'ha de determinar, per exemple, com una població de cèl·lules T activades es pot mantenir a tracte respiratori inferior sense ser causa de problemes d'autoimmunitat.

## **F. Virus potencialment pandèmics i pandèmics del segle XXI**

Recentment, a més dels tres virus de la grip que circulen habitualment de forma estacional a la població mundial, s'hi han afegit dos virus més. El virus de la grip A aviària (H5N1), amb potencial pandèmic, però sense capacitat de transmissió interhumana i el virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009, causa de la primera pandèmia del segle XXI.

### **F.1. Virus de la grip A aviària (H5N1)**

L'any 1996, es va aïllar un virus de la grip A (H5N1) a partir de les oques, durant un brot epidèmic de grip aviària de gran patogenicitat en les aus de corral a la província xinesa de Gaungdong (A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)). Aquest va ser l'origen del virus de la grip A aviària (H5N1) causant del brot de grip en els pollastres de Hong Kong l'any 1997, que va ser causa d'infecció greu en humans; una tercera part (6 de 18) dels casos van ser mortals (26, 126, 127). La impossibilitat d'aquest virus per transmetre's eficientment de persona a persona, va impedir l'inici d'una nova pandèmia. Aquest subtipus H5N1 no presentava fenòmens de reagrupament

genètic amb virus humans, els vuit segments del seu genoma eren en la seva totalitat d'origen aviari. La principal preocupació durant el brot va ser la potencial coinfecció de l'home per virus humans i aviaris, que pogués donar lloc a un nou virus, per reagrupament genètic, amb capacitat de transmissió interhumana i ser l'origen d'una nova pandèmia. Això es va poder neutralitzar mitjançant el sacrifici massiu de pollastres als mercats d'aus vives de Hong Kong.

Aquesta va ser la primera constància que tenim de la possibilitat de replicació dels virus aviaris en cèl·lules humanes. La segona es produiria anys més tard, arran de la reconstitució del virus de 1918 a partir de cadàvers congelats a Alaska i determinar-se la seva possible natura aviària (23).

Després de l'eradicació dels virus de la grip A aviària (H5N1) de Hong Kong, el virus precursor va continuar circulant entre les oques al sud de la Xina, sent causa de nous brots als mercats d'aus vives de Hong Kong en els anys 2001 i 2002, sense casos humans, que van ser de nou eradicats. El virus precursor va continuar circulant a la Xina.

Els virus de la grip A aviària (H5N1) aïllats a partir d'ànecs al sud de la Xina entre 1999 i 2002, eren tots antigènicament similars al virus precursor de les oques. Probablement, els ànecs van tenir un paper important en la generació del virus responsable del brot epidèmic en el Sud-est asiàtic, que es va iniciar l'any 2003.

L'anàlisi genètica de les soques del virus de la grip A aviària (H5N1) aïllades, durant el període 2000-2004, a partir de pollastres i dels casos d'infecció humana a Xina, Hong Kong, Indonèsia, Tailàndia i Vietnam, ha demostrat que era el resultat de freqüents fenòmens de reagrupació genètica, entre el virus precursor (A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)) i diferents virus aviaris, que finalment va donar lloc a un genotipus dominant, el genotipus Z (128). Aquest genotipus, gràcies a la seva extraordinària eficàcia biològica, va iniciar l'actual brot de grip aviària de gran patogenicitat al Sud-est asiàtic, passant a ser enzoòtic en la població de pollastres d'aquesta àrea i difonent-se a Europa i Àfrica (128-132).

El virus de la grip A aviària (H5N1), de gran patogenicitat, té una sèrie de característiques de gran interès patogènic: es troba en constant evolució; no tan sols és causa de mortalitat en pollastres, algunes variants també ho són en

aus aquàtiques, el seu reservori natural; es repliquen i són causa de mortalitat en ratolins sense mecanisme previ d'adaptació; han infectat amb una gran mortalitat diferents espècies de mamífers; la seva virulència en fures ha augmentat al llarg dels anys, indicant l'adquisició de mutacions que incrementen el seu poder patogen en mamífers i, finalment, són causa d'una constant transmissió a la població humana amb una gran mortalitat.

El 2 de juny de 2009 s'han confirmat 433 casos d'infecció humana pel virus de la grip A aviària (H5N1), dels quals 262 han estat mortals (5). Tot i l'existència de diverses agrupacions familiars, no hi ha transmissió sostinguda de persona a persona. Les característiques i la gravetat dels casos humans es van descriure per primera vegada l'any 2004 al Vietnam (133). Els pacients eren joves que acudien a l'hospital amb un quadre de pneumònia adquirida a la comunitat. La pneumònia és una constant en la majoria de casos, amb una radiografia de tòrax similar a la de la síndrome de destret (*distress*) respiratori de l'adult. La leucopènia i la trombocitopènia són comunes i alguns casos cursen amb diarrea com a simptomatologia de presentació. Contràriament a la grip epidèmica, existeix una infecció disseminada en la majoria de casos, que inclou replicació viral en el sistema nerviós central i afectació cardíaca, hepàtica, renal i digestiva, com a conseqüència de l'HA de gran patogenicitat. Aquesta circumstància és crítica per a la utilització d'antivírics que no tinguin una bona biodisponibilitat a nivell sistèmic. La presència de nivells elevats de citocines està directament implicada en la mortalitat dels casos. Encara que limitada, l'actual evidència sembla indicar l'absència de casos lleus o asimptomàtics que puguin passar desapercebuts (134).

Aquesta és una situació dinàmica produïda per un virus aviari altament patogen, posseïdor d'una hemaglutinina d'àmplia processabilitat que li confereix un elevat poder patogen, que manté l'especificitat pels receptors aviaris, que es troba en constant evolució, que sembla posseir una bona capacitat d'adaptació, ja que ha incrementat el seu espectre d'espècies susceptibles, que és causa d'un brot de difícil control i que pot ser difós per aus migratòries. Mentre es perpetui aquesta situació, s'incrementa la possibilitat d'aparició d'un nou virus pandèmic, bé sigui per reagrupament genètic amb un virus humà o bé mitjançant variacions menors d'adaptació a l'organisme humà.

## **F.2. Virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009**

El 21 d'abril de 2009, els Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (135) d'EUA van publicar una nota comunicant l'observació d'una malaltia respiratòria febril en dos nens que residien en llocs propers de la zona del sud de Califòrnia, deguda a un virus de la grip A (H1N1) d'origen porcí. El virus aïllat era pràcticament idèntic en tots dos pacients, resistent a amantadina i rimantadina, i amb una combinació de segments genètics única, no detectada prèviament entre els virus gripals coneguts. Els pacients no havien tingut contacte amb porcs, per la qual cosa la font d'infecció era desconeguda. La possibilitat de transmissió de persona a persona es va considerar elevada. Els CDC expressaven ja la seva preocupació pel fet que el nou virus de la grip A (H1N1) era substancialment diferent en el virus de la grip A (H1N1) estacional humana, per la qual cosa un gran percentatge de la població pogués ser susceptible de ser infectada. També indicaven la seva preocupació pel fet que la vacuna actual enfront de la grip estacional pogués no conferir protecció davant aquest nou virus. Aquesta situació no semblava nova. Cada any es donen als EUA un o dos casos de grip humana per un virus d'origen porcí (136,137), encara que en la majoria de casos amb antecedents d'exposició a aquest animal (138).

Dos dies després, el divendres 24 d'abril, s'advertia de l'existència d'una epidèmia d'una malaltia respiratòria, probablement grip porcina, a Mèxic, especialment localitzada a la capital del país. Les primeres notícies parlaven de gairebé mil casos greus i més de vuitanta persones mortes, dades que posteriorment van ser objecte de revisió i confirmació, reduint considerablement les primeres estimacions. Laboratoris del Canadà i els mateixos CDC, van confirmar que alguns dels casos de Mèxic es devien al mateix virus de la grip A.

Pocs dies més tard s'havien identificat centenars de casos per aquest virus als EUA (3), fonamentalment a Califòrnia, Texas i Nova York, la majoria associats amb viatges recents a Mèxic. L'OMS va considerar que el nou virus representava un important risc per a la població mundial (3). La situació d'alerta pandèmica de l'OMS va pujar, en pocs dies, del nivell 3 al 4 i del 4 al 5, per assolir finalment el nivell 6 l'11 de juny de 2009. És a dir, la constatació que

actualment estem en plena pandèmia de grip per aquest nou virus. Aquest virus es va denominar nou virus de la grip A (H1N1) o virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009.

L'aparició d'un nou virus de la grip, capaç de causar malaltia en els éssers humans i que es transmet de forma eficaç i sostenible de persona a persona a escala mundial, afectant a més de dos regions de l'OMS, són les tres condicions bàsiques que l'OMS té en compte per considerar un virus de la grip com a pandèmic. El virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009 ha demostrat complir-les, encara que causant, en la majoria de casos i en principi, un quadre clínic similar a la grip estacional. Ara bé, pandèmia no és sinònim de gravetat clínic o mortalitat, sinó tan sols d'extensió (nombre de casos i localització geogràfica) d'una malaltia.

Des dels primers dies, l'activació a escala mundial dels plans pandèmics i en especial de la vigilància epidemiològica, clínic i virològica, va ser molt exhaustiva, cosa que va permetre la ràpida identificació i tractament dels casos i el seguiment i la profilaxi dels contactes, fent possible una certa contenció inicial de la difusió viral. Cal destacar, també, la cobertura sense precedents per part dels mitjans de comunicació, que en ocasions va comportar reaccions i actituds poc assenyades tant en la població com en determinats àmbits polítics.

El 26 d'abril, es van notificar al nostre país els tres primers casos d'infecció pel nou virus de la grip A (H1N1), tots amb antecedents de viatge a Mèxic (139). Fins el 26 de juny de 2009, s'han notificat un total de 541 casos confirmats, 37 a Catalunya. L'edat mitjana és de 19 anys (1-71 anys), i el 56,7% són homes. El país de procedència per als casos confirmats amb antecedents de viatge va ser Mèxic en 88 casos, la República Dominicana a 5 i els Estats Units en 30. Els primers casos greus a Espanya van aparèixer el 27 de juny, un a Madrid i l'altre a Catalunya. Una dona de dinou anys amb asma i embarassada de set mesos i un home de trenta-dos anys respectivament, tots dos ingressats a les unitats de cures intensives (UCI) corresponents i que van morir dies després a conseqüència de l'infecció gripal.

El 26 de juny de 2009, 105 països havien comunicat oficialment 59.814 casos confirmats (3). D'aquests, el 83,3% corresponen a la regió de les Amèriques; el 6,9% a la regió europea; el 9,5% a la regió del Pacífic Occidental i el 0,3% a l'Orient Mitjà. Els països que més casos han notificat són els Estats

Units (27.717), Mèxic (8.279), Canadà (7.775), Xile (5.186), Austràlia (4.038) i el Regne Unit (4.250). S'havien notificat un total de 180 morts, a la regió de les Amèriques (113 a Mèxic, 44 als Estats Units, 12 a Canadà, 2 a Xile, 4 a l'Argentina, 1 a la República Dominicana, Costa Rica, Colòmbia, Guatemala) i a Europa (1 a al Regne Unit).

El 16 de juliol del 2009 l'OMS va decidir, a conseqüència de l'ample distribució mundial del virus, finalitzar amb el recompte individualitzat de casos. El virus ha trigat 3 mesos a donar tota la volta al món, tot i la seva baixa capacitat de transmissió (nombre bàsic de transmissió,  $R_0$  1,58-2,04). Els actuals mitjans de comunicació són un important factor en aquest fet, però la ràpida difusió viral també ha estat present a les anteriors pandèmies. Altres factors també són determinants, com el breu període d'incubació (3-4 dies), el llarg període de transmissibilitat (48 hores abans d'iniciar-se el quadre clínic fins a 7 dies després) i especialment el temps ràpid de generació de nous casos, de tan sols 1,9 dies, inferior al temps d'incubació.

Durant aquest mesos la principal preocupació ha estat que passaria durant la tardor-hivern en el nostre entorn, quan les condicions socials i meteorològiques afavoreixen els brots epidèmics de grip i altres virus respiratoris. En aquest sentit, el seguiment de la pandèmia a l'hemisferi Sud, on aquestes estacions tenen lloc de maig a octubre, ha estat de gran interès. Les dades d'Austràlia i Nova Zelanda, països amb una bona xarxa de metges sentinella de grip i de registre de casos, han estat especialment valuoses (141-143). En resum, la presentació clínica ha estat un quadre lleu/moderat, amb símptomes similars als presentats en els casos de grip estacional i amb bona evolució cap a la recuperació. L'afectació global ha estat d'un 11% de la població amb un 30% de casos asimptomàtics. Un 0,2%-0,5% dels casos simptomàtics han estat ingressats i d'aquests un 12% a l'UCI (molt superior a l'habitual per grip estacional). Els casos greus s'han produït, en el 65% dels casos, en població que presentava factors de risc, especialment malalties cròniques, immunodeficiències i també embaràs i obesitat mòrbida. La població afectada es trobava en edats compreses entre els 18 i els 50 anys, amb una baixa afectació dels majors de 65 anys. La mortalitat a l'UCI ha estat del 17% a conseqüència, a la meitat dels casos, d'una pneumònia viral primària que no s'observa entre les complicacions habituals de la grip estacional. Finalment, la

mortalitat per grip pandèmica ha estat, en aquests països, de 29 casos per milió d'habitants.

Si bé en el seu conjunt aquestes xifres són similars a les de la grip estacional, les principals diferències es troben centrades en els casos greus. Aquests es presenten en població jove, sense factors de risc en un terç dels casos i amb una elevada mortalitat per pneumònia viral primària.

En gran mesura, aquestes dades s'estan reproduint a l'inici de la tardor a l'hemisferi Nord, tot i que hi han factors com la superior densitat de població que poden ser decisius en l'evolució futura de la pandèmia a les nostres latituds.

A Catalunya (144), les dades del PIDIRAC durant la setmana 41 (11/10/09-17/10/09) presenten una taxa d'incidència de síndromes gripals de 87 per 100.000 habitants, molt similar a l'observada a les tres setmanes anteriors, que situen l'activitat gripal en el llindar de l'umbral epidèmic (a Catalunya 100 casos per 100.000 habitants). El grup d'edat amb major taxa d'incidència és el de 5-14 anys seguit del de 0-4 anys, com és habitual als inicis dels brots epidèmics de grip. La majoria de casos han presentat un quadre gripal lleu, amb una recuperació en pocs dies. Des de l'inici de la pandèmia s'han detectat un total de 49 casos greus amb una mitjana d'edat de 37 anys (un 30% del quals no presentaven factors de risc) i un 12% de mortalitat (6 casos).

Des del punt de vista virològic, les principals preguntes que cal fer amb referència a aquest nou virus pandèmic són: quin és el seu origen?; es podia haver predit?; existeix protecció creuada amb els virus estacionals? i, finalment, quina serà la seva evolució futura?

*Quin és el seu origen?* Actualment es desconeix a quina àrea geogràfica es van produir els fenòmens de reagrupament genètic responsables de la seva aparició. Les anàlisis filogenètiques, obtingudes mitjançant la seqüenciació completa del genoma, dels primers virus aïllats als EUA demostren (105), que el virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009 conté sis segments (PB2, PB1, PA, HA, NP i NS) similars als presents en els virus de la grip porcina, amb reagrupament triple, que circulen en aquestes poblacions d'animals als EUA (145,146). Els gens de la NA i la M estan estretament relacionats amb els virus de la grip A presents a les poblacions porcines d'Europa i Àsia. Aquesta

combinació genètica no havia estat mai observada prèviament. El virus de la grip A porcina dels EUA amb triple reagrupament genètic es compon dels gens HA, NP, NA, M i NS originaris de virus de la grip A porcina clàssica; els gens PB2 i PA provenen de virus aviaris de llinatge nord-americà i, finalment, el gen PB1 té el seu origen en el virus de la grip A humana (H3N2).

*És podia haver predit?* Als EUA, entre els anys 1930 i 1990, el virus de la grip A porcina clàssica (H1N1) va circular com a virus majoritari, sense canvis genètics importants. A finals de la dècada de 1990 van emergir, de forma majoritària en els porcs, diverses soques i subtipus (H1N1, H3N2 i H1N2) de virus de la grip A portadors d'una reagrupació genètica triple (145,146).

En els últims trenta-cinc anys s'han detectat més de cinquanta casos d'afectació humana per virus de la grip A porcina clàssica (136).

Hi ha quatre casos publicats d'infecció humana per virus de la grip porcina amb reagrupació triple (137, 147-149); el primer l'any 2005, tot i que el CDC ha rebut onze notificacions entre desembre de 2005 i febrer de 2009, vuit de les quals des de juny de 2007 (150). És important destacar que en cap d'aquests casos la sospita clínica inicial va ser la de grip porcina. Tots els casos es van diagnosticar en el context de la vigilància epidemiològica i virològica, que incorpora xarxes de metges sentinella. És a dir, el nombre de casos està probablement subestimat. Diversos estudis seroepidemiològics han demostrat un major risc d'infecció en persones exposades ocupacionalment en els porcs (151-153).

Donat el potencial zoonòtic dels virus porcins, és molt important introduir-los en el diagnòstic diferencial de la síndrome gripal en persones amb antecedents d'exposició en aquests animals.

És necessari establir una major i més intensa col·laboració entre les agències de salut humana i animal, per establir programes conjunts de vigilància i recerca, que permetin identificar i neutralitzar tots aquells virus animals amb potencial per causar brots a la població, abans que es difonguin a la comunitat.

*Existeix protecció creuada amb el virus estacionals?* Els alineaments de les seqüències de l'HA i la NA del virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009 demostren que són substancialment diferents de les del virus de la grip estacional A (H1N1), tot i pertànyer al mateix subtipus (154). L'HA té una



divergència de fins un 27,2% respecte del virus de la grip A estacional (H1N1) que va circular el 2008 o que va formar part de la vacuna de grip de la temporada 2008-2009. Contràriament, la divergència amb l'HA del virus de la grip A (H1N1) de la pandèmia de grip Espanyola de 1918 tan sols és del 18%. Hancock K et al (155) han descrit recentment l'existència d'anticossos neutralitzants, enfront el nou virus pandèmic, en el 34% dels nascuts abans de 1950 en els EUA, probablement per exposició prèvia al virus del 1918, que va circular a la població mundial fins l'any 1957. Aquest fet podria explicar, en part, la baixa incidència de grip A pandèmica (H1N1) 2009 en els majors de 65 anys d'edat. Els mateixos autors també demostren l'absència d'anticossos protectors en població vacunada enfront la grip A estacional (H1N1).

*Quina serà la seva evolució futura?* De moment coneixem determinats factors virals: l'HA és de baixa patogenicitat; en canvi, els aminoàcids de l'HA implicats en la unió al receptor cel·lular reconeixen tant els receptors humans com els aviaris (156), que com ha estat comentat prèviament, es troben presents a nivell alveolar, fet que podria explicar, en part, el desenvolupament de pneumònia viral primària greu, quadre clínic que no és causat pels virus de la grip estacional; contràriament als virus pandèmics de 1957 i 1968, en el nou virus de la grip la majoria de segments del genoma són d'origen animal, la qual cosa podria determinar la baixa capacitat de transmissió actual del virus; presenta un perfil de baixa patogenicitat a les posicions 627 i 701 del gen PB2 i 92 del gen NS1 (vegeu «factors de predicció»); i és sensible als inhibidors de la neuraminidasa, tot i ser resistent als adamantans. Això últim és a causa de la incorporació del gen M dels virus de la grip A presents a les poblacions porcines d'Europa i Àsia que, a diferència dels virus americans, són portadors de la mutació Ser31Asn de resistència a aquests fàrmacs.

Però, com evolucionarà en el futur? No es pot predir amb els coneixements actuals. Com qualsevol virus de la grip té un important potencial d'evolució. El major grau de variabilitat viral es produeix quan el virus és obligat a fer-ho. Per exemple, quan afecta la població humana i es veu sotmès a importants pressions selectives de tipus immunitari a tracte respiratori. Aquestes pressions seleccionen les variants més ben adaptades, és a dir, aquelles resistents a la resposta immunitària. El virus encara no ha estat sotmès a pressió immunològica, la futura vacunació de la població mundial ho

farà. Per tant, és molt possible, com esdevé cada any amb la grip estacional, que sigui necessari modificar l'actual vacuna de la grip en el futur immediat. D'altra banda, el virus ha circulat sota una pressió farmacològica prou important amb oseltamivir. És important vigilar la possible aparició de soques resistents a aquest fàrmac, que no oblidem ha estat àmpliament emmagatzemat a tots els països per fer front als virus pandèmics. Fins a l'actualitat s'han detectat 28 soques virals resistents a l'oseltamivir, associades fonamentalment al tractament de malalts immunodeprimits o a la profilaxi post-exposició.

Un aspecte important és que la cocirculació amb els virus de la grip estacional conduís a un reagrupament genètic amb aquests, adquirint aquells fragments humans del genoma que li permetin una major capacitat de replicació i transmissió interhumana, per donar lloc a un nou virus amb un potencial pandèmic molt superior. Per exemple, la NA del virus de la grip A estacional (H1N1) és 100% resistent a l'oseltamivir. Tampoc podem oblidar la possibilitat de reagrupament amb el virus de la grip A aviària (H5N1) en el Sud-est asiàtic, fet que podria generar un virus de gran patogenicitat i amb capacitat de transmissió interhumana.

És impossible predir quina serà l'evolució d'aquest nou virus en els propers mesos. La millor mesura de prevenció és l'establiment d'una vigilància epidemiològica i virològica molt estreta, per detectar, immediatament que es produeixin, els canvis que afectin a la capacitat de transmissió i a la virulència, per tal d'actuar en conseqüència amb gran celeritat, posant en marxa tots aquells mecanismes dels plans pandèmics adreçats a mitigar al màxim els efectes sobre la població.

## **G. Conclusions**

Encara que actualment és del tot impossible establir factors de predicció amb els virus de la grip, el seu potencial patogènic és pot anticipar d'una forma molt més precisa, gràcies als programes intensius de recerca, i al desenvolupament i millora de la vigilància, el diagnòstic i els estudis genètics del virus i els seus reservoris. En un futur coneixerem aquells factors decisius en l'aparició de virus pandèmics, com els que determinen la transmissió interespecie, el reagrupament genètic i la transmissió interhumana.

No podem oblidar que l'evolució d'una pandèmia no es pot predir basant-nos en la història passada. És a dir, les decisions són dinàmiques a mesura que s'acumula coneixement. La primera ona pandèmica del virus de la grip Espanyola de 1918 es va caracteritzar per una baixa patogenicitat en humans, però el virus va mutar cap a una variant amb major virulència, que va ser causa de la important mortalitat en les següents ones pandèmiques. És necessari fer una vigilància virològica i epidemiològica molt intensa de l'actual virus de la grip A pandèmica (H1N1) 2009, per detectar l'aparició de variants amb una major virulència. Tanmateix, és molt important que aquestes decisions es prenguin basant-se en fets, l'evidència científica i les recomanacions dels experts en salut pública i no seguint directrius polítiques, interessos dels mitjans o la pressió popular.

Paral·lelament, aquest virus també presenta l'oportunitat única de seguir la evolució viral a temps real i obtenir una informació de gran vàlua en els factors de patogenicitat i transmissibilitat.

Finalment, mentre aquests coneixements no arribin, la síntesi de nous fàrmacs antivirals, la detecció de noves dianes terapèutiques, i la introducció de noves tecnologies i estratègies en el desenvolupament i utilització de les vacunes, continuaran constituint la mesura més eficaç per fer front a les pandèmies i els brots epidèmics pels virus de la grip.

## Bibliografía

1. Glezen WP. Serious morbidity and mortality associated with influenza epidemics. *Epidemiol Rev.* 1982; 4:25-44
2. van Genugten MLL, Heijnen MLA, Jager JC. Pandemic influenza and healthcare demand in the Netherlands: Scenario analysis. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:531-538
3. <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html>. Accedit el 29/06/09
4. [http://www.who.int/topics/infectious\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/). Accedit el 29/06/09
5. [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/). Accedit el 29/06/09
6. Shope RE. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med* 1931; 54:373-385
7. Rodríguez-Torres A. *Epidemiología y ecología de la gripe A*. Valladolid, Sever Cuesta, 1982
8. Beveridge WIB. *Influenza: the last great plague. An unfinished history of discovery*. London, Heinemann, 1977
9. Nguyen VT, Hampson AW. The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. *Vaccine* 2003; 21:1762-1768.
10. Trilla A, Trilla G, Daer C. The 1918 "Spanish Flu" in Spain. *Clin Infect Dis* 2008; 47:668-73
11. Dowdle WR, Coleman MT. Properties of the Hong Kong influenza virus.  
2. Antigenic relationship of the Hong Kong virus hemagglutinin to that of other human influenza A viruses. *Bull WHO* 1969; 41:419-424
12. Pumarola A, Rodríguez Torres A, Beltrán M. La gripe Hong Kong en Barcelona. *Med Trop* 1970; 1-4:221-250
13. Pumarola A, Rodríguez Torres A. Anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación del virus gripal A2 en la población de Barcelona. *Med Clin (barc)* 1969; 52:489-494
14. Lamb RA, Krug RM. 2001 *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. En: Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields virology* 4th. p.1487-1532 Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia

15. Fouchier RAM, Osterhaus ADME, Brown IH. Animal influenza virus surveillance. *Vaccine* 2003; 21:1754-1757.
16. Schafer JR, Kawaoka Y, Bean WJ, Suss J, Senne D and Webster RG. Origin of the pandemic 1957 H2 influenza A virus and the persistence of its possible progenitors in the avian reservoir. *Virology* 1993; 194: 781-788.
17. Kaplan MW, Webster RG. La epidemiología de la gripe. *Invest Ciencia* 1978; 17:52-63
18. Palese P. The genes of influenza virus. *Cell* 1977; 10:1-10
19. Scholtissek C. Influenza virus genetics. *Adv Genet* 1979; 20:1-49
20. Laver WG. The hemagglutinin of influenza viruses: Structure, immunology and biological function. *J Infect Dis* 1978; 138:105-109
21. Eickhoff TC, Meiklejohn G. Protection against Hong Kong influenza by adjuvant vaccine containing A2-Ann Arbor-67. *Bull World Health Organ* 1969; 41:562–563
22. Belshe RB. The origins of pandemic influenza. Lessons from the 1918 virus. *New Engl J Med* 2005; 353:2209-11
23. Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE and Fanning TG. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* 1997; 275: 1793–1796
24. Reid AH, Fanning TG, Hultin JV and Taubenberger JK. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999; 96:1651–1656
25. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/centres/en/index.html>. Accedit el 29/06/09
26. Hatta M, Kawaoka Y. The continued pandemic threat posed by avian influenza viruses in Hong Kong. *Trends Microbiol* 2002; 10:340-344
27. Munster VJ, de Wit E, van Riel D, Beyer WE, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Kuiken T, Fouchier RA. The molecular basis of the pathogenicity of the Dutch highly pathogenic human influenza A H7N7 viruses. *J Infect Dis* 2007; 196:258-65
28. Pumarola T, Dominguez A, Martinez A, Marcos A, Muñoz C, Cañas A, Ruiz M, Jiménez de Anta MT, Salleras L. "Vigilancia Viroológica de la Gripe, 2001-2002. *Vacunas* 2002; 3:134-140

29. Pumarola T, Dominguez A, Marcos MA, Martinez A, Muñoz C, Cañas A, Ruiz M, Jiménez MT, Salleras L y Grupo de Trabajo de Vigilancia de la Gripe en Cataluña. Vigilancia Viroológica de la Gripe (2002-2003). *Vacunas* 2003; 4:119-126
30. Snacken R, Manuguerra JC, Taylor P. European Influenza Surveillance Scheme on the internet. *Methods Inf Med* 1998; 37:266-270
31. Kash JC, Tumpey TM, Proll SC, Carter C, Perwitasari O, Thomas MJ, et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature* 2006; 443:578–581
32. Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kas JC, Copps J, Ebihara H, et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 2007; 445:319–323
33. de Jong MD, Simmons CP, Than TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nature Med* 2006; 12:1203–1207
34. Kobasa D, Takada A, Shinya A, Hatta M, Halfmann P, Theriault S, et al. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 2004; 431:703–707
35. Tumpey TM, García-Sastre A, Mikulasova A, Taubenberger JK, Swayne DE, Palese P and Basler CF. Existing antivirals are effective against influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99:13849–13854
36. Tumpey TM, García-Sastre A, Taubenberger JK, Palese P, Swayne DE and Basler CF et al. Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004; 101:3166–3171
37. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solórzano A, Swayne DE and Basler CF. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005; 310:77–80
38. Watanabe T, Watanabe S, Shinya K, Kim JH, Hatta M and Kawaoka Y. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009; 106:588–592

39. Van Hoeven N, Pappas C, Belser JA, Maines TR, Zeng H, García-Sastre A, et al. Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009; 106:3366–3371
40. Geiss GK, Salvatore M, Tumpey TM, Carter VS, Wang X, Basler CF, et al. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99:10736–10741
41. McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith Am, McKeon R, Bennink J, et al. Expression of the 1918 influenza A virus PB1–F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* 2007; 2:240–249
42. Peiris JS, de Jong MD and Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin. Microbiol. Rev* 2007; 20:243–267
43. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 2007; 25:5637–5644
44. Dugan VG, Chen R, Spiro DJ, Sengamalay N, Zaborsky J, Ghedin E, et al. The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog* 2008; 4:e1000076
45. Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, Su X, Mukatira S, Finkelstein DB, et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* 2006; 311:1576–1580
46. Webster RG. Wet markets—a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza?, *Lancet* 2004; 363:234–236
47. Swayne DE. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis* 2007; 51:242–249
48. Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y and Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.* 1999; 73:1146–1155
49. Perez DR, Lim W, Seiler JP, Yi G, Peiris M, Shortridge KF and Webster RG. Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A

- viruses: molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chickens. *J. Virol.* 2003; 77:3148–3156
50. Rimmelzwaan GF, van Riel D, Baars M, Bestebroer TM, van Amerongen G, Fouchier RA, Osterhaus AD and Kuiken T. Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *Am. J. Pathol* 2006; 168:176–183
51. Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Pariyothorn N, Payungporn S, et al. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog, *Emerg. Infect. Dis* 2006; 12:1744–1747
52. Rogers GN and Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 1983; 127:361–373
53. Ludwig S, Stitz L, Planz O, Van H, Fitch WM and Scholtissek C. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic?. *Virology* 1995; 212:555–561
54. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* 1998; 72:7367–7373
55. Scholtisrek C, Hinshow VS, Olsen CW. Influenza in pigs and their role as the intermediate host. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, eds. *Textbook of Influenza*. Oxford, Blackwell 1998; pp 137-144.
56. Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swerson SL, Erickson G, Rossow K, et al. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in american pigs. *J. Virol* 1999; 73: 8851-8856.
57. Gregory V, Lim W, Cameron K, Bennett M, Marozin S, Klimov A, et al. Infection of a child in Hong Kong by an influenza A H3N2 virus closely related to viruses circulating in European pigs. *J. Gen. Virol* 2001; 82: 1397-1406.
58. Ma W, Vincent AL, Gramer MR, Brockwell CB, Lager KM, Janke BH, et al. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104:20949–20954
59. Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC and Wilson IA. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from



- modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J. Mol. Biol* 2006; 355:1143–1155
60. Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC and Wilson IA. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 2006; 312:404–410
61. Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 2006; 444:378–382
62. Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A and Klimov A. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* 2006; 344:432–438
63. Auewarakul P, Suptawiwat O, Kongchanagul A, Sangma C, Suzuki Y, Ungchusak K, et al. An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J. Virol* 2007; 81:9950–9955
64. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA and Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101:4620–4624
65. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N and Kawaoka Y, Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006; 440:435–436
66. van Riel D, Munster VJ, de Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD and Kuiken T, Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am. J. Pathol* 2007; 171:1215–1223
67. Nicholls JM, Chan MC, Chan WY, Wong HK, Cheung CY, Kwong DL, et al. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nat. Med* 2007; 13:147–149
68. Hatta M, Gao P, Halfmann P and Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 2001; 293:1840–1842
69. Subbarao EK, London W and Murphy BR. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J. Virol.* 1993; 67:1761–1764

70. Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, Damrongwatanapokin S, Theamboonlers A, Payungporn S, et al. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:699-701.
71. Hatta M, Hatta Y, Kim JH, Watanabe S, Shinya K, Nguyen T, et al. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog* 2007; 3:e133
72. Massin P, van der Werf S and Naffakh N. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses. *J. Virol* 2001; 75:5398–5404
73. Steel J, Lowen AC, Mubareka S and Palese P. Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog* 2009; 5:e1000252
74. Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, et al. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J. Virol* 2005; 79:12058–12064
75. Gabriel G, Abram M, Keiner B, Wagner R, Klenk HD and Stech J. Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus. *J. Virol* 2007; 81:9601–9604
76. Kawaoka Y and Webster RG. Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1988; 85:324–328
77. Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology* 2001; 279:375–384
78. Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, Palese P and Muster T. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 1998; 252:324–330
79. Seo S, Hoffmann E and Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nature Med* 2002; 8:950–954
80. Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J. Virol* 2008; 82:1146–1154

81. Li Z, Jiang Y, Jiao P, Wang A, Zhao F, Tian G, et al. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J. Virol* 2006;80:11115–11123
82. Peiris JS, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng WF, Nicholls JM, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 2004; 363:617–619
83. To KF, Chan PK, Chang KF, Lee WK, Lam WY, Wong KF, et al. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J. Med. Virol* 2001; 63:242–246
84. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* 2002; 360:1831–1837
85. Guan Y, Poon LL, Cheung CY, Ellis TM, Lim W, Lipatov AS, et al. H5N1 influenza: a protean pandemic threat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004; 101:8156–8161
86. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Med.* 2001; 7:1306–1312
87. Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R and Palese P. Influenza virus PB1–F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* 2005 1:e4
88. Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T and Palese PA. single mutation in the PB1–F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog.* 2007; 3:e141
89. Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, et al. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science* 2008; 320:340-346
90. Fedson DS. Pandemic influenza and the global vaccine supply. *CID* 2003; 36:1552-1561.
91. Hayden FG. Perspectives on antiviral use during pandemic influenza. *Phil Trans R Soc Lond* 2001; 356:1877-1884

92. WHO. Influenza pandemic preparedness plan. Responding to an influenza pandemic or its threat: the role of WHO and guidelines for national or regional planning. Geneva: WHO 1999
93. Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, Jones M, Pietrantoni CD, Rivetti A. Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. *Lancet* 2006; 367: 303-313
94. Nicholson KG, Wiselka MJ. Amantadine for influenza A. *BMJ* 1991; 302:425-426.
95. Tominack RL, Hayden FG. Rimantadine hydrochloride and amantadine hydrochloride use in influenza A virus infections. *Infect Dis Clin North Am* 1987;1: 459-478.
96. Wintermeyer SM, Nahata MC. Rimantadine: a clinical perspective. *Ann Pharmacother* 1995; 29: 299-31
97. Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 2005; 353: 1363-73
98. Gubareva LV, Kaiser L, Hayden KJ. Influenza virus neuramidase inhibitors. *Lancet* 2000; 355: 827-835.
99. Bardsley-Elliot A, Noble S. Oseltamivir. *Drugs* 1999; 58: 851-860
100. Cher SM, Wagstaff AJ. Zanamavi. An update of its use in influenza. *Drugs* 2002; 62: 71-106.
101. Centers for Disease Control. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2004; 53: 1-40.
102. Hayden FG. Antiviral resistance in influenza viruses—implications for management and pandemic response. *N. Engl. J. Med* 2006; 354:785–788
103. Weinstock DM, Zuccotti G. Adamantane resistance in influenza A. *JAMA*. 2006;295:934-936
104. Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA*. 2006;295:891-894
105. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. Emergence of a novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009; 360: 2605-2615

106. Aoki FY, Boivin G, Roberts N. Influenza virus susceptibility and resistance to oseltamivir. *Antivir Ther.* 2007;12:603-616
107. Ives JA, Carr JA, Mendel DB; Tai CY, Lambkin R, Kelly R, et al. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 2002;55:307-317
108. Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, Hampson AW, Hay A, Klimov A, et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2395-2402
109. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:3284-3292
110. Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA, et al, Oseltamivir-Resistance Working Group. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA.* 2009;301:1034-1041
111. Gooskens J, Jonges M, Claas ECJ, Meijer A, van den Broek PJ, Kroes ACM. Morbidity and mortality associated with nosocomial transmission of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus. *JAMA.* 2009;301:1042-1046
112. Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, Hungnes O. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:155-162
113. Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, NguyenKH, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 2005; 437:1108
114. Weinstock, D. M., Gubareva, L. V. & Zuccotti, G. Prolonged shedding of multidrug-resistant influenza A virus in an immunocompromised patient. *N. Engl. J. Med* 2003; 348:867–868
115. World Health Organization. Table: Influenza A(H1N1) Virus Resistance to Oseltamivir: Last Quarter 2007 to 2 June 2008 (Update 13

June 2008). <http://www.who.int/csr/disease/influenza/ResistanceTable200806013.pdf>. Accedit el 29/06/09

116. Rameix-Welti MA, Enouf V, Cuvelier F, Jeannin P, van der Werf S. Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000103
117. Collins PJ, Haire LF, Lin YP; et al. Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature.* 2008;453:1258-1261
118. Hayden F. Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clin Infect Dis.* 2009;48:S3-S13
119. Yamashita M, Tomozawa T, Kakuta M, Tokumitsu A, Nasu H, Kubo S, et al. CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity. *Antimicrob. Agents Chemother* 2009; 53:186–192
120. Furuta Y, Takahashi K, Kukuda Y, Kuno M, Kamiyama T, Kozaki K, et al. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46:977–981
121. Subbarao K and Joseph T. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:267–278
122. Govorkova EA, Webby RJ, Humberd J, Seiler JP and Webster RG. Immunization with reverse-genetics-produced H5N1 influenza vaccine protects ferrets against homologous and heterologous challenge. *J Infect Dis* 2006; 194:159–167
123. Watanabe T, Watanabe S, Kim JH, Hatta M and Kawaoka Y. A novel approach to the development of effective H5N1 influenza A virus vaccines: the use of M2 cytoplasmic tail mutants. *J Virol* 2007; 82:2486–2492.
124. Rimmelzwaan GF, Fouchier RA and Osterhaus AD. Influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: a correlate of protection and a basis for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18:529–536
125. Wang M, Lamberth K, Harndahl M, Roder G, Stryhn A, Larsen MV, et al. CTL epitopes for influenza A including the H5N1 bird flu;

- genome-, pathogen-, and HLA-wide screening. *Vaccine* 2007; 25:2823–2831
126. Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998; 279:393–396
  127. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, de Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 1998; 351:472–477
  128. Smith GJ, Fan XH, Wang J, Li KS, Qin K, Zhang JX, et al. Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006; 103:16936–16941
  129. Chen H, Smith GJ, Li KS, Wang J, Fan XH, Rayner JM, et al. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: Implications for pandemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103:2845–2850
  130. Guan Y, Peiris JS, Lipatov AS, Ellis TM, Dyrting KC, Krauss S, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99:8950–8955
  131. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 2004; 430:209–213
  132. Ducatez MF, Olinger CM, Owoade AA, Landtsheer S, Ammerlaan W, Niesters HG, et al. Avian flu: multiple introductions of H5N1 in Nigeria. *Nature* 2006; 442:37
  133. Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen VC, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 2005; 350:1179-88.
  134. Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med* 2006;. 354:884.
  135. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Swine influenza A (H1N1) infection in two children-southern California, March-April 2009. *MMWR* 2009; 58:400-402

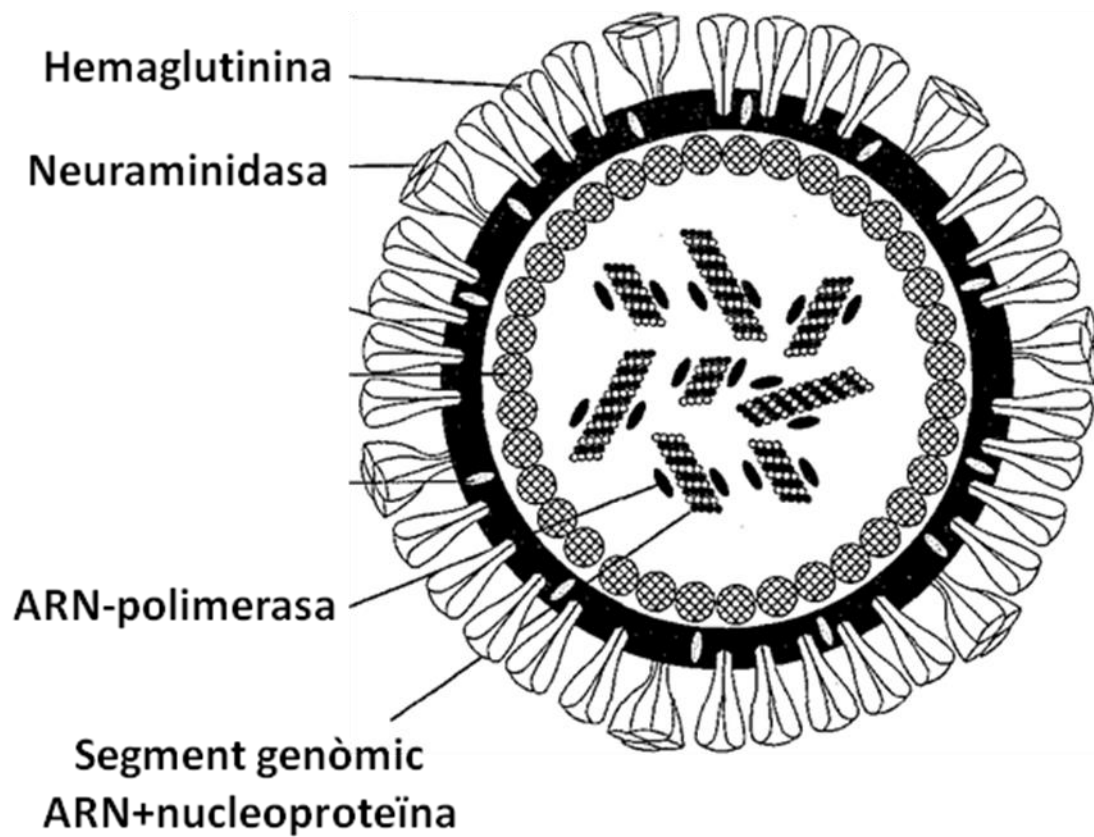
136. Myers KP, Olsen CW, Gray GC. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis* 2007;44:1084-1088
137. Newman AP, Reisdorf E, Beinemann J, Uyeki Tm, Balish A, Shu B, et al. Human case of swine influenza A (H1N1) triple reassortant virus infection, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1470-1472
138. Wells DL, Hopfensperger DJ, Arden NH, Harmon MW, Davis JP, Tipple MA and Schonberger LB. Swine influenza virus infections: transmission from ill pigs to humans at a Wisconsin agricultural fair and subsequent probable person-to-person transmission. *JAMA* 1991;265:478-481
139. <http://www.msc.es>. Accedit el 29/06/09
140. <http://flu.gov/professional/global/southhemisphere.html>
141. <http://www.emergency.health.nsw.gov.au>
142. Baker MG, Wilson N, Huang QS, Paine S, Lopez L, Bandaranayake D, et al. Pandemic influenza A (H1N1)v in New Zealand: The experience from April to August 2009. *Eurosurveillance* 2009; 14(34)27Agosto:1-6
143. The ANZIC Influenza Investigators. Critical Care Services and 2009 H1N1 Influenza in Australia and New Zealand. *N Engl J Med* 2009; 361: 1-10
144. <http://gencat.cat>
145. Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res* 2002;85:199-210
146. Vincent AL, Ma W, Lager KM, Janke BH, Richt JA. Swine influenza viruses: a North American perspective. *Adv Virus Res* 2008;72:127-154
147. Olsen CW, Karasin AI, Carman S, Li Y, Bastien N, Ojkic B, et al. Triple reassortant H3N2 influenza A viruses, Canada, 2005. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1132-1135
148. Gray GC, McCarthy T, Capuano AW, Setterquist SF, Olsen CW, Alavanja MC. Swine workers and swine influenza virus infections. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1871-1878
149. Bastien N, Bowness D, Burton L, et al. Parotitis in a child infected with triple reassortant influenza A, Canada. *J Clin Microbiol* 2009 April 1 (Epub ahead of print).



150. Shinde V, Bridgers CB, Uyeki TM, Shu B, Balish A, Xu X, et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med* 2009; 360:2616-2625
151. Myers KP, Olsen CW, Setterquist SF, Capuano AW, Donham KJ, Thacker EL, Merchant JA and Gray GC. Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus? *Clin Infect Dis* 2006;42:14-20
152. Olsen CW, Brammer L, Easterday BC, Arden N, Belay E, Baker I and Cox NJ. Serologic evidence of H1 swine influenza virus infection in swine farm residents and employees. *Emerg Infect Dis* 2002;8:814-819
153. Ramirez A, Capuano AW, Wellman DA, Leshner KA, Setterquist SF, Gray GC. Preventing zoonotic influenza virus infection. *Emerg Infect Dis* 2006;12:996-1000
154. Gallaher WR. Towards a sane and rational approach to management of influenza H1N1 2009. *Virology* 2009; 6:51
155. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *N Engl J Med* 2009; 361; 10.1056/NEJMoa0906453
156. Childs RA, Palma AS, Wharton S, Matrosovich T, Liu Y, Chai W, et al. Receptor-binding specificity of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus determined by carbohydrate microarray. *Nature Biotechnology* 2009; 27:797-9

**Taula 1. Segments genòmics del virus de la grip A**

<b>Segment de ARN</b>	<b>Producte gènic</b>	<b>Funció</b>
<b>1</b>	<b>PB2</b>	<b>Complex de la polimerasa.</b>
<b>2</b>	<b>PB1</b>	<b>Transcripció i replicació del</b>
<b>3</b>	<b>PA</b>	<b>ARN</b>
<b>4</b>	<b>HA (hemaglutinina)</b>	<b>Unió en el receptor cel·lular</b>
<b>5</b>	<b>NP (nucleoproteïna)</b>	<b>Component principal de la</b>
		<b>càpside</b>
<b>6</b>	<b>NA (neuraminidasa)</b>	<b>Hidròlisi de l'àcid siàlic i</b>
		<b>sortida cel·lular del virions</b>
<b>7</b>	<b>M1 (proteïna matriu)</b>	<b>Maduració viral</b>
	<b>M2</b>	<b>Decapsidació</b>
<b>8</b>	<b>NS1</b>	<b>Proteïna no estructural.</b>
		<b>Inhibidor de l'interferó</b>
	<b>NS2</b>	<b>Proteïna no estructural</b>



**Figura 1. Virus de la grip. Partícula viral**