



Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

COMITÉ CIENTÍFICO DE RIESGOS BIOLÓGICOS

**Informe del Comité Científico de Riesgos Biológicos sobre:**

**Los alimentos como posible fuente de infección por virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos  
Marzo de 2006- 21ª sesión plenaria**

Este exhaustivo documento de referencia realiza un análisis científico de la posibilidad de que los alimentos actúen como vehículos del virus de influenza aviar (IA) altamente patógena y provoquen una infección en mamíferos a través del tracto gastrointestinal. El documento examina en detalle los datos patogénicos existentes sobre las infecciones por el virus de la influenza aviar tras la exposición natural y la inoculación experimental en mamíferos. El objeto central del estudio son las interacciones del virus-huesped de la infección por H5N1.

El contenido de este documento, facilitado por el Comité Científico de Riesgos Biológicos, sirve de apoyo para la postura actual y las referencias de la AESA sobre la influenza aviar en relación con la seguridad alimentaria.

*“Según se ha comprobado, las personas que se han infectado han estado en contacto directo con aves infectadas vivas o muertas. No existe ninguna prueba epidemiológica hasta la fecha de que la influenza aviar se transmita a las personas a través del consumo de alimentos, especialmente volatería y huevos. La AESA y otras organizaciones como la OMS llevan aconsejando desde hace tiempo en materia de seguridad alimentaria que se cocinen adecuadamente el pollo y los huevos para proteger a los consumidores de los posibles riesgos de intoxicación por alimentos. Al cocinar bien la carne de volatería y los huevos, se eliminan también los virus, lo cual proporciona una mayor seguridad en el improbable caso de que el virus H5N1 esté presente en productos de volatería crudos que entren en la cadena alimentaria.”*



# Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

## RESUMEN

Ante la presencia de la cepa H5N1 de la influenza aviar en la UE y el aumento de la preocupación del público en general respecto a la seguridad en el consumo humano de productos de volatería y huevos, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria solicitó que se redactara un documento de referencia exhaustivo sobre el estado de la ciencia respecto al futuro de la influenza aviar altamente patógena (principalmente H5N1) en especies de aves y el posible contagio del virus a otras especies, incluidos los humanos, a través de la cadena alimentaria.

El virus altamente patógeno H5N1 causa una infección generalizada en diferentes especies de aves, provocándose la propagación del virus a todos los órganos. El virus está presente en todas las secreciones y excreciones. Si se toman los tejidos comestibles de un animal infectado en el momento de máxima infección, es decir, 2 o 5 días después de que el contacto con el virus haya tenido lugar, puede que estos contengan grandes cantidades del virus.

El contagio directo de H5N1 a los humanos ocurre en raras ocasiones y especialmente tras un contacto muy cercano con los animales infectados. Las rutas exactas de entrada del virus en los humanos son aún desconocidas, pero se da por sentado que los tejidos respiratorios y los orofaríngeos son los puntos de entrada. Sin embargo, si tenemos en cuenta que el número de infecciones humanas registradas es bajo en comparación con el elevado número de personas que se han visto expuestas a animales infectados con el virus H5N1, parece obvio que no existe una vía de entrada fácilmente accesible. Se ha planteado la posibilidad de la entrada del virus por el tracto gastrointestinal tras la ingesta del virus con alimentos. Por el momento no existen pruebas de la replicación del virus en el intestino humano. La presencia de diarrea en diferentes pacientes, la detección de ARN vírico en los intestinos de dos pacientes y la aparición de virus infecciosos en hisopos rectales de un paciente no permiten concluir que el tracto gastrointestinal sea una vía de entrada o un órgano objetivo. El virus transmitido por medio de alimentos puede ser una fuente de infección tras la ingesta, pero la entrada del virus se produce mediante los tejidos orofaríngeos, en el caso de que estos puedan servir de vía de entrada. Sin embargo, no puede descartarse que exista un punto de entrada aún sin descubrir en el tracto intestinal en este momento.

En los felinos, las infecciones por H5N1 pueden ocurrir de forma natural tras el consumo de canales infectadas de especies de aves y pueden reproducirse mediante suministro para la alimentación oral de pollos infectados. Sin embargo, no se ha demostrado que el tracto gastrointestinal sea una vía de contagio o un órgano objetivo en dichas especies.

La base patogénica por la que el virus H5N1 causa infección en unos humanos y no en otros sigue siendo desconocida. Se está analizando el papel de los diferentes factores víricos y de huéspedes como los receptores, los puntos de unión al receptor, estructura genética de la cepa vírica, cantidad de virus en exposición, etc. Será necesario seguir investigando sobre este aspecto y sobre el tracto gastrointestinal.



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

En varias especies de mamíferos (incluidos los felinos, roedores y mustélidos), el H5N1 muestra un carácter neurotrópico, lo cual posiblemente merezca más atención en la patogénesis de las infecciones en humanos.

Las rutas de entrada y los tipos de células que permiten el acceso del virus y el mecanismo de cruce de la barrera interespecífica serán objeto de estudio. Algunos mamíferos, como los gatos, los hurones o los cerdos pueden servir de modelos para las infecciones humanas. Es necesario que los estudios de inoculación experimental se lleven a cabo con diferentes rutas de inoculación y qué se realicen exámenes secuenciales de los diferentes tejidos para la replicación del virus durante la infección. Esta aproximación es la única que permite evitar las conjeturas sobre las vías de entrada y las rutas de infección. Los resultados obtenidos puede facilitar información útil que sea de aplicación en humanos.



# Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

ANTECEDENTES .....	5
TÉRMINOS DE REFERENCIA .....	7
<b>ASPECTOS DE SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LAS INFECCIONES POR VIRUS DE INFLUENZA AVIAR ALTAMENTE PATÓGENA EN HUMANOS .....</b>	<b>7</b>
<b>1. FUTURO DE LOS VIRUS DE INFLUENZA AVIAR (PRINCIPALMENTE LOS SUBTIPOS H5 Y H7) EN TEJIDOS DE ESPECIES DE AVES.....</b>	<b>8</b>
1.1 VIRUS EN ÓRGANOS DE POLLOS Y PAVOS .....	9
1.2 VIRUS EN ÓRGANOS DE PATOS Y GANSOS .....	10
1.3 VIRUS EN HUEVOS .....	11
1.4. VIRUS EN EXCRECIONES Y SECRECIONES.....	11
1.5. CONCLUSIONES.....	12
1.6. INFORMACIÓN CIENTÍFICA PENDIENTE.....	12
<b>2. INFECCIÓN DE MAMÍFEROS POR VIRUS DE IAAP .....</b>	<b>12</b>
2.1. INFECCIÓN Y PATOGÉNESIS EN HUMANOS.....	13
2.2. INFECCIÓN Y PATOGÉNESIS DE MAMÍFEROS DIFERENTES DE LOS HUMANOS.....	15
2.2.1. <i>Infección natural</i> .....	16
2.2.2. <i>Inoculación experimental</i> .....	17
<i>Inoculaciones orales</i> .....	17
<i>Inoculaciones intranasales e intratraqueales</i> .....	17
<i>Múltiples puntos de inoculación</i> .....	19
2.3. CONCLUSIONES.....	19
2.4. INFORMACIÓN CIENTÍFICA PENDIENTE.....	20
<b>3. FACTORES DE VIRUS Y DE HUÉSPEDES QUE POSIBLEMENTE INTERVENGAN EN LAS INFECCIONES EN HUMANOS (CON REFERENCIA AL TRACTO GASTROINTESTINAL) .....</b>	<b>21</b>
3.1 RECEPTORES DEL VIRUS DE INFLUENZA Y PUNTOS DE UNIÓN AL RECEPTOR.....	21
3.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS Y CONFIGURACIÓN GENÉTICA .....	22
3.3.1. <i>Algunas consideraciones</i> .....	23
3.3.2. <i>Cantidad de virus en la exposición</i> .....	25
3.3.3. <i>Efectos de un pH bajo en virus de IA</i> .....	25
3.4 CONCLUSIONES.....	26
3.5. INFORMACIÓN CIENTÍFICA PENDIENTE.....	27
<b>4. MIEMBROS DEL COMITÉ CIENTÍFICO .....</b>	<b>27</b>
<b>5. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>27</b>
<b>6. REFERENCIAS.....</b>	<b>27</b>



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

### ANTECEDENTES

La Agencia Europea para la Seguridad Alimentaria (AESA) es consciente de que no existe información epidemiológica disponible hasta la fecha que sugiera que la influenza aviar, una enfermedad infecciosa que afecta principalmente a las aves, pueda transmitirse a los humanos a través de los alimentos. No obstante, dado que la influenza aviar tiene cada vez más peso, el Comité Científico de la AESA de Riesgos Biológicos (BIOHAZ) mantiene el asunto en constante revisión. La AESA coincide con las referencias aportadas por autoridades sanitarias como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades (ECDC), que indican que la ruta de infección por el virus de influenza aviar H5N1 más probable en humanos es el contacto cercano con aves vivas infectadas. El consumo de productos de volatería o huevos no se ha relacionado con la transmisión del virus H5N1 de influenza aviar a los humanos. En el caso de que se produjera un brote de H5N1 en las aves de Europa, se establecerían inmediatamente estrictas medidas de bioseguridad para limitar el alcance de la infección por cualquier medio.

La AESA hizo una declaración inicial sobre la influenza aviar en enero de 2004, en la que afirmaba que no existían pruebas directas de que la cadena alimentaria fuera una posible ruta de transmisión del virus de la influenza aviar ([http://www.efsa.eu.int/press\\_room/press\\_statements/40/pressrel\\_biohaz\\_ahaw\\_01\\_en\\_amed\\_27jan1.pdf](http://www.efsa.eu.int/press_room/press_statements/40/pressrel_biohaz_ahaw_01_en_amed_27jan1.pdf)). La AESA hizo una declaración el 12 de septiembre de 2005 ([http://www.efsa.eu.int/press\\_room/press\\_statements/1130\\_en.html](http://www.efsa.eu.int/press_room/press_statements/1130_en.html)), en la que exponía de manera general el trabajo que estaba realizando sobre la sanidad y el bienestar animal en cuanto a la influenza aviar, y en la que reiteraba, respecto a la seguridad alimentaria, las recomendaciones de la OMS sobre manipulación y cocción de alimentos en relación con la influenza aviar.

El 20 de septiembre de 2005, la AESA publicó un Dictamen e Informe sobre la sanidad y el bienestar animal en cuanto a la influenza aviar, y facilitó información sobre los riesgos de la introducción de la Unión Europea de la influenza aviar y su contagio entre las aves. La AESA también realizó recomendaciones sobre cómo prevenir su introducción y contagio entre bandadas en Europa. Este informe ha supuesto la base científica de las medidas de gestión del riesgo de influenza aviar ya en marcha en Europa con respecto a la sanidad animal ([http://www.efsa.eu.int/press\\_room/press\\_release/1146\\_en.html](http://www.efsa.eu.int/press_room/press_release/1146_en.html)).

Otras organizaciones que han dado referencias e información sobre la seguridad de la manipulación, preparación y cocción de los alimentos son principalmente autoridades en materia de seguridad alimentaria, la Organización Mundial de la Salud (OMS) (<http://www.who.int>) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades (ECDC) que ha facilitado referencias sobre los aspectos de sanidad pública de la influenza aviar (<http://www.ecdc.eu.int/>).

La AESA ha basado sus anteriores afirmaciones en los siguientes datos científicos:

- La información científica sobre la influenza aviar indica que el virus puede estar presente en la carne y los huevos de aves que estén infectadas con la mutación H5N1 de la influenza aviar (Swayne y Beck, 2004; Swayne y Beck, 2005).



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

- Los casos documentados de ciertas especies de animales que con diferentes grados de infección a través del consumo de carne de volatería y huevos crudos.
  - Por ejemplo, un estudio experimental, llevado a cabo por Kuiken y colaboradores (2004), demostró que había gatos que se infectaron al ser alimentados con pollos infectados. Existe otra documentación según la que también hay tigres que contrajeron la infección de forma similar al ser alimentados con canales de pollo fresco procedentes de un matadero local (Keawcharoen y colaboradores, (2004). Según estos informes, los gatos (felinos) parecen ser relativamente susceptibles a la cepa H5N1 y pueden contagiarse tras el consumo de canales de pollos infectados (página 17, anexo del Informe Científico de la AESA sobre la sanidad y el bienestar animal en cuanto a la influenza aviar, 2005)
  - La introducción de los virus aviarios en cerdos tampoco es un hecho inusual (resumen en el informe de la AESA nombrado anteriormente, página 15) Por ejemplo, los cerdos que se encontraban en explotaciones donde se habían detectado aves infectadas durante la epidemia de influenza aviar en los Países Bajos desarrollaron anticuerpos que, en un caso, estaban vinculados con el suministro de huevos rotos de aves infectadas para su alimentación ( Loeffen et al, 2003,2004)
  - De la misma manera, el mismo informe científico de la AESA (página 46) también considera que puede existir suficiente presencia de virus en la carne de las aves infectadas para contagiar a otras aves si la consumieran cruda. En efecto, existen muchas pruebas circunstanciales de la infección de ciertas especies animales a través de los alimentos y por tanto, como medida de precaución, este tipo de transmisión en animales no se puede descartar.
- Entre los casos de H5N1 registrados en humanos, principalmente en Asia, existen dos casos de H5N1 supuestamente relacionados con el consumo de productos derivados de sangre de pato crudo infectado (Fuente: Actualización sobre aspectos epidemiológicos de H5N1 por P. Horby, presentado en el “Groupe d’étude d’information sur la grippe”. 18th European Meeting on Influenza and its prevention, 19 de septiembre de 2005 en La Baule, Francia). Sin embargo, ya que el contacto directo con animales infectados vivos o muertos sin tratar no puede descartarse en estos casos, los datos epidemiológicos son insuficientes para confirmar que el consumo de productos infectados es la única ruta de transmisión.
- De entre los 118 casos registrados de infección humana, la mayoría de los producidos en Asia han estado asociados con la exposición directa a aves infectadas muertas o vivas. Sin embargo, en muchos casos, no existen pruebas epidemiológicas suficientes para identificar cuál es la fuente de la infección (OMS) [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/avian\\_faqs/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/avian_faqs/en/index.html)
- Mientras que el nivel de acidez del estómago humano (valor del pH de 1-3) tiene la capacidad de eliminar el virus, que es lo mismo que se cree que sucede con la gripe normal, este efecto depende de diferentes factores, como por ejemplo la cepa vírica, la cantidad de virus presente en el tracto gastrointestinal y otros factores gastrointestinales locales (p.ej. el tiempo de tránsito intestinal, la deficiencia adquirida del ácido de la barrera gástrica debido a una infección de *Helicobacter pylori*, que es bastante común entre los ancianos sanos, etc.) y la naturaleza y la composición del



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

contenido gástrico. Sin embargo, existen pocos datos científicos sobre este aspecto hoy en día. Lo que sí es cierto es que, en el caso hipotético de que un virus infeccioso se encontrase en los alimentos, la cocción apropiada de la carne de volatería y los huevos eliminará todo virus presente antes del consumo y por tanto eliminará incluso la posibilidad teórica de una infección por virus a través del consumo de alimentos.

### **TÉRMINOS DE REFERENCIA**

Ante la expansión de la cepa H5N1 de la influenza aviar en la UE y el aumento de la preocupación del público en general respecto a la seguridad en el consumo humano de productos de volatería y huevos, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria solicita la redacción de un documento de referencia exhaustivo sobre el estado de la ciencia respecto al futuro de los virus de influenza aviar altamente patógena (principalmente H5N1) en especies de aves y el posible contagio del virus a otras especies, incluidos los humanos, a través de la cadena alimentaria. El documento debe incluir los aspectos científicos de los obstáculos que debe superar el virus para poder infectar a otras especies, en especial a los humanos, y las barreras gastrointestinales que pueden neutralizar al virus tras el consumo de productos contaminados. La localización de las lagunas del conocimiento científico actual también sería muy útil.

### **ASPECTOS DE SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LAS INFECCIONES POR VIRUS DE INFLUENZA AVIAR ALTAMENTE PATÓGENA EN HUMANOS**

El objetivo de esta monografía consiste en presentar datos y reflexiones sobre la probabilidad de que se produzca la infección por virus de influenza aviar en humanos tras el consumo de alimentos procedentes de especies de aves infectadas o que hayan sido contaminadas por los virus.

Primero, se analizará la presencia de los virus de influenza aviar en órganos o productos comestibles durante una infección.

En segundo lugar, se facilitarán los datos disponibles sobre la patogénesis de infecciones humanas con virus de influenza aviar de los subtipos H5 y H7.

Se hará referencia a los posibles puntos de entrada de los virus con especial atención al tracto gastrointestinal. Se revisará la información obtenida mediante estudios patogénicos llevados a cabo en mamíferos diferentes a los humanos con virus de influenza aviar altamente patógena, ya que esto puede facilitar la localización de posibles rutas de infección y órganos objetivo en humanos.

Por último, se analizará la probabilidad de que los virus de influenza aviar altamente patógena, principalmente H5N1, puedan desencadenar la infección humana a través del consumo de alimentos. Se subrayará igualmente la falta de información científica en este análisis.



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

### **1. FUTURO DE LOS VIRUS DE INFLUENZA AVIAR (PRINCIPALMENTE LOS SUBTIPOS H5 Y H7) EN TEJIDOS DE ESPECIES DE AVES**

Los virus de influenza aviar están muy extendidos en la naturaleza y han sido detectados en más de 90 especies diferentes de aves. Las aves acuáticas salvajes son reservas naturales de estos virus y pueden ser infectadas por virus de los 16 subtipos de hemaglutinina (HA) y los 9 subtipos de neuraminidasa sin desarrollar la enfermedad.

Los virus de influenza aviar pueden agruparse en 2 patotipos en aves domésticas: virus de influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) y virus de influenza aviar altamente patógena (IAAP). Los virus de IABP principalmente causan infecciones del tracto respiratorio y entérico y la infección es subclínica en la mayoría de las especies de aves. Las infecciones pueden caracterizarse por leves síntomas respiratorios, algo de depresión y una reducción de la producción de huevos.

La replicación de los virus de IAAP no sólo se produce en el tracto respiratorio y en el entérico, sino también en las células endoteliales a través del organismo, expandiéndose a las células parenquimatosas adyacentes. Los síntomas de la enfermedad afectan al tracto respiratorio y al entérico y a otros sistemas de órganos. Las lesiones se caracterizan por múltiples hemorragias en los órganos viscerales y en la piel, y el índice de mortalidad alcanza el 100%. La infección por virus de IAAP, por tanto, implica una amplia propagación en el organismo y la presencia de los virus en diversos órganos y tejidos comestibles.

Algunos de los subtipos de virus H5 y H7, aunque no todos, pueden ser altamente patógenos. Los subtipos H5 y H7 de baja patogenicidad pueden tener la capacidad de volverse altamente patógenos. Las aves salvajes pueden actuar como portadores sanos de virus H5 y H7 de baja patogenicidad y transmitir dichos virus a las aves domésticas. Tras un periodo corto o largo de circulación en la población aviar, dichos virus pueden adquirir un fenotipo de HP por mutación. Los virus de influenza aviar tienen como huéspedes naturales a varias especies de aves, y la transmisión horizontal entre estas especies o dentro de las mismas ocurre con cierta facilidad. Las rutas de entrada del virus en las aves son principalmente el tracto respiratorio (aspersión, en gotitas) y el tracto digestivo (orofecal...) tras el contacto directo entre animales vivos o tras exposición indirecta (alimentos, agua y u otros elementos contaminados). La transmisión de los virus en aves domésticas, por tanto, ocurre fácilmente en áreas infectadas. Aunque los virus de IAAP aparecen normalmente en bandadas de aves tras la introducción de un virus de IABP procedente de aves salvajes, acaba de detectarse una nueva evolución. Parece que algunas especies de aves salvajes están expandiendo directamente el virus H5N1 en su forma más altamente patógena, por ejemplo, durante la migración. Incluso pueden desarrollar la enfermedad tal y como se observó en la China central, donde 6000 aves migratorias murieron a causa de una infección del subtipo H5N1 de IAAP en la reserva natural del lago Qinghai (Liu et al. 2005). Los virus de IAAP pueden por tanto recorrer largas distancias y ser transportados desde regiones infectadas a otras no infectadas por las aves migratorias.

Los virus de IAAP tienen una glicoproteína de HA que puede ser escindida por proteasas ubicuas que se encuentran prácticamente en todos los órganos, y de los que la furina es una de las principales candidatas (Steineke-Grober et al. 1992). Los virus de IABP, por otro lado,



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

sólo pueden escindirse mediante enzimas tipo tripsina, que se encuentran principalmente en los tractos respiratorio y entérico. La presencia de múltiples aminoácidos básicos en el punto de corte de la HA se asocia con la alta capacidad de escisión de la HA y, por tanto, con la capacidad de los virus de IAAP para introducirse y replicarse en múltiples órganos de las aves domésticas (pollo, pavo...), mientras que la replicación de los virus de IABP se limita al tracto respiratorio y al digestivo.

### 1.1 VIRUS EN ÓRGANOS DE POLLOS Y PAVOS

Los apartados siguientes describen el futuro de los virus de influenza aviar tanto de patogenicidad alta como baja en diferentes tejidos, secreciones y excreciones de especies de aves infectadas. Los datos que aquí se expresan no son exhaustivos sino que se presentan a modo de ejemplo, ya que se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la patogénesis y la propagación de los virus de IAAP en aves, que son base importante de varios tipos de alimentos.

Se han aislado los virus de influenza aviar de diferentes órganos de pollos y pavos que se habían infectado de manera natural o experimental con virus de IAAP o IABP. El tropismo de tejidos, los títulos virales en diferentes órganos y el grado de viremia, no obstante, pueden variar notablemente entre las diferentes cepas y entre las especies de aves. La mayor parte de los ensayos experimentales se han realizado en pollos, y existe menos información sobre los pavos y otras aves domésticas.

Se han aislado virus de IABP del subtipo H7N2 del tracto respiratorio y gastrointestinal de pollos inoculados de manera experimental, pero no de la médula ósea, la sangre, ni la carne de la pechuga o el muslo (Swayne y Beck 2005).

Los virus de IAAP, por el contrario, se han localizado en los tractos gastrointestinal y respiratorio, en la médula ósea, el tejido muscular, en sangre y en diferentes órganos internos (Mase et al. 2005a, Swayne y Beck 2005, Muramoto et al. 2006). En un estudio la cepa H5N1 examinada se replicó en títulos virales superiores a los de la cepa H5N2 (Swayne y Beck 2005) Los títulos virales en los músculos de la pechuga y del muslo eran de un valor de 107.3 EID50 por gramo de tejido con la cepa H5N1, mientras que la cepa H5N2 daba títulos virales pico de 102.7 por gramo de carne de pechuga y 103.2 EID50 por gramo de muslo. Los títulos virales en pulmones y sangre alcanzan los 106.0 EID50 por gramo de tejido y 101.4 EID50 por ml respectivamente con la cepa H5N2, pero no se analizaron para el virus H5N1.

Los títulos virales en órganos internos de pollos inoculados con aislamientos de H5N1 altamente patógeno de Japón alcanzaron los 107.5 EID50 por gramo de tejido, una vez transcurridos entre 2 y 4 días tras la inoculación del virus (Mase et al. 2005a). Los títulos virales en la sangre de pollos inoculados con un virus recombinado portador de la HA del virus Hong Kong/97 H5N1 eran de 108.0 EID50 por ml una vez transcurridas 24 horas tras la inoculación (Muramoto et al. 2006).

Tras la inoculación experimental de pavos con 10 virus de IABP pertenecientes a diferentes subtipos de HA, la mayoría de los aislamientos procedían de los riñones, el hígado, la bolsa omental y la unión ileocecal, pero sólo algunos se encontraban en el cerebro, el timo, el pulmón, el bazo, el páncreas y el yeyuno (Laudert et al. 1993). Puede que estos resultados no



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

reflejen la infección natural porque los animales fueron sometidos a una inoculación intravenosa, y por tanto se les causó una viremia artificial y se permitió a los virus que alcanzasen todos los tejidos.

Las inoculaciones intranasales de pavos con virus H5N1 altamente patógenos procedentes del brote de Hong Kong de 1997 revelaron la presencia de virus infecciosos en el tracto respiratorio superior, los pulmones, el corazón, el cerebro, el páncreas, la médula ósea, la bolsa omental, el timo, el bazo, los testículos, las glándulas adrenales y los folículos de pluma, pero los títulos virales no se determinaron (Perkins y Swayne 2001)

### 1.2 VIRUS EN ÓRGANOS DE PATOS Y GANSOS

Los virus de IAAP también pueden provocar la enfermedad en aves acuáticas, tanto domésticas como salvajes, pero, normalmente, con un carácter mucho menos fulminante. Aún así, se los puede aislar de diferentes tejidos, incluidos los productos comestibles. La carne de pato ha tenido resultados positivos en cuanto a los virus de IAAP durante la inspección rutinaria de aves importadas. El virus H5N1, por ejemplo, se detectó en carne congelada de patos subclínicamente infectados, importada de China a Corea del Sur (Tumpey et al. 2002) y Japón (Mase et al. 2005a). Estos virus se usaron después para los ensayos de inoculación en patos, pollos y ratones (Tumpey et al. 2003, Mase et al. 2005a). La cepa de virus obtenida de la carne de pato de Corea del Sur causó una mortalidad del 100% en pollos y del 22% en ratones, mientras que los patos siguieron sanos a pesar de tener títulos virales altos en el cerebro, los pulmones, los riñones (con una cantidad de 106.8 EID<sub>50</sub> por gramo de tejido) y músculo (llegando a los 105.5 EID<sub>50</sub> por gramo) (Tumpey et al. 2002, 2003). El aislamiento de carne de pato realizado en Japón era altamente patógeno para los pollos, se replicaba bien en los pulmones de los ratones y se extendía al cerebro, pero no era tan patógeno en los ratones como los aislamientos de H5N1 de humanos. 2005b).

El aislamiento de H5N1 de carne de pato importada a Japón se replicó en múltiples órganos de los patos tras una inoculación experimental, y provocó síntomas neurológicos en algunos de los animales inoculados (Kishida et al. 2005). Los títulos virales en sangre estaban entre 100.7 y 102.3 EID<sub>50</sub> por ml y los del hígado y los riñones, entre 104.5 y 107.5 EID<sub>50</sub> por gramo de tejido. La información anterior demuestra claramente que los virus de IAAP pueden acabar en todos los productos comestibles procedentes del pato aunque los animales no estén enfermos en el matadero.

Las inoculaciones experimentales de gansos con un virus H5N1 altamente patógeno de 1997 mostraron la replicación del virus en el cerebro, pulmones y riñones (Perkins y Swayne 2002). Al cuarto día tras la inoculación, los títulos virales ascendían a 106.7 EID<sub>50</sub> por gramo de cerebro, 102.8 EID<sub>50</sub> por gramo de pulmones y 103.6 EID<sub>50</sub> por gramo de riñones.

Los virus de IAAP se propagan ampliamente por el organismo de las aves domesticadas, incluidos gansos y patos. Cuando se sacrifican aves infectadas durante el grado máximo de infección, los virus pueden estar presentes en grandes cantidades en todos los tejidos comestibles crudos y en la sangre.

Durante un brote de influenza H5N1 altamente patógena en aves acuáticas (gansos, patos y cisnes) y otras aves salvajes (flamencos, cercetas y garzas) en Hong Kong en 2002, se



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

tomaron muestras de unas 80 aves muertas (Ellis et al. 2004). Se aisló el virus de los pulmones, el cerebro, hisopos de cloaca y orofaríngeo, en 68 de las 88 aves examinadas, e indicó que los productos comestibles procedentes de las especies de aves de caza también podían tener altos títulos virales de IAAP.

### 1.3 VIRUS EN HUEVOS

Se aislaron los virus de la albúmina, unas muestras de yemas y de la superficie de la cáscara de huevos durante el brote de 1983 de IAAP (H5N2) en Pensilvania (Cappucci et al. 1985) pero no durante otro brote de IAAP (H7N2) en 2001 – 2002 (Lu et al. 2004). También se han detectado virus de IAAP en huevos de pollos y pavos infectados experimentalmente (Moses et al. 1948, Narayan et al. 1969, Beard et al. 1984, Starick y Werner 2003), tanto en la superficie de los huevos como en el interior. Los virus detectados en la superficie de los huevos probablemente provengan de una contaminación fecal debida al paso de los huevos a través de la cloaca. Los virus detectados en el interior de los huevos probablemente se deban a una viremia o a la replicación de los virus en el oviducto, ya que dichos huevos dieron positivo, especialmente cuando la puesta había tenido lugar en los 3 o 4 días posteriores a la inoculación. Sin embargo, el grave curso de la infección, la repentina disminución del número de huevos y la rápida mortalidad de las gallinas ponedoras minimizan el riesgo de que se pongan huevos infectados.

En contraposición con los virus de IAAP, los de IABP no se han aislado de hisopos de cáscara de huevo, albúmina o muestras de yemas de pollos naturalmente infectados (Lu et al. 2004). Sin embargo, los virus se han aislado del oviducto de pollos durante un brote de H7N2 en Pensilvania (1996-1998), y se registraron con frecuencia casos de salpingitis aguda, lo cual hace pensar que los virus de IABP pueden tener la capacidad de depositarse en los huevos (Ziegler et al. 1999).

No existe información disponible sobre la presencia de virus en huevos procedentes de patos infectados por virus de influenza aviar.

### 1.4. VIRUS EN EXCRECIONES Y SECRECIONES

Considerando los puntos de replicación de los virus de influenza aviar y el carácter generalizado de la infección por virus de IAAP, puede ser que diferentes secreciones y excreciones porten virus, y a veces en grandes cantidades.

Los pollos inoculados con un virus H5N2 altamente patógeno excretaban virus por las aberturas nasales, la boca, la conjuntiva y la cloaca. Los títulos virales una vez transcurridos 3 días tras la inoculación alcanzaron los 104.2-106.5 EID50 por ml de secreción orofaríngea y a 104.5 EID50 por ml de heces (Swayne y Beck 2005).

Los pollos inoculados con el virus H5N1 altamente patógeno excretaban cantidades de virus de hasta 104.6 EID50 por ml en la orofaringe y 104.5 EID50 por ml de heces en los 2 o 3 días posteriores a la inoculación (Tian et al. 2005). En otro experimento, se hallaron títulos de hasta 107,5 EID50 por ml de heces en pollos inoculados con H5N1 sacrificados a las 24 horas de la inoculación (Rimmelzwaan et al. 2006).

Las inoculaciones experimentales de ánades reales con un virus de IABP revelaron títulos virales que alcanzaban los valores de 105.8 EID50 por ml en hisopos de la traquea y la cloaca entre 2 y 4 días posteriores a la inoculación (Webster et al. 1978). Los patos y gansos infectados de manera natural o experimental por virus de IAAP H5N1 también han mostrado



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

grandes cantidades de virus tanto en los hisopos orofaríngeos como en los de la cloaca (Perkins y Swayne 2002, Tian et al. 2005, Ellis et al. 2004).

Estos datos demostraron que el material fecal puede contener cantidades muy altas (títulos) de virus tanto altamente patógenos como de baja patogenicidad. El material fecal puede, por tanto, ser una fuente importante de virus de influenza aviar en diferentes especies de aves. Las heces excretadas por aves seriamente infectadas pueden contaminar fácilmente todo tipo de productos alimentarios y agua. Sin embargo, las cantidades de virus de objetos contaminados será inferior a las de los órganos de animales infectados.

### 1.5. CONCLUSIONES

Las cepas de virus de IAAP están ampliamente propagadas por el organismo de las aves enfermas (pollos y pavos) así como en especies subclínicamente infectadas como los patos. Todos los productos comestibles derivados de dichos animales pueden considerarse portadores de virus en cantidades variables.

Las cantidades de virus llegarán a su punto más alto cuando los materiales de la muestra (sangre, carne, secreciones, excreciones, vísceras...) hayan sido obtenidos durante el grado máximo de la infección, que se produce entre 2 y 5 días después del contacto con el virus. Teniendo en cuenta el grave curso de la infección en los pollos, las cantidades de virus pueden ser altas al final del periodo de incubación y poco antes de que el animal caiga enfermo. Los virus de IAAP se excretan en grandes cantidades durante las fases más graves de la enfermedad. Las excreciones, especialmente las heces, pueden por tanto contaminar todo tipo de alimentos y de agua.

Los virus de IABP tienen un patrón de infección más restringido en el que el tracto respiratorio y el entérico son los órganos objetivo principales. La probabilidad de que haya virus presentes en los productos comestibles, por tanto, es inferior pero sigue siendo real.

### 1.6. INFORMACIÓN CIENTÍFICA PENDIENTE

En realidad, no existe información científica pendiente en este punto. Las cantidades de virus presentes en alimentos de origen aviar variarán considerablemente entre las cepas de virus, las especies de aves, el tipo de órgano, el grado de viremia y otros factores como la fase de la infección en que se obtuvieron los productos. Esta variación biológica estará siempre presente y no se puede determinar específicamente para cada variable. También, las cantidades de virus se verán influenciadas por los posibles tratamientos físicos o químicos que se lleven a cabo en productos comestibles (calentados o cocinados) o los procesos fisiológicos que puedan ocurrir( por ej. cambios del pH en la carne tras el sacrificio).

## 2. INFECCIÓN DE MAMÍFEROS POR VIRUS DE IAAP

Casi todos los casos de infecciones por virus de IAAP en humanos han tenido como causa los virus altamente patógenos H5 o H7 que se transmitieron directamente de aves infectadas a humanos. Aunque dichas infecciones humanas generalmente son el resultado de un contacto directo e intenso con aves infectadas o enfermas, se han sugerido otras rutas de infección, como el consumo de tejidos comestibles de aves infectadas o el contacto con agua contaminada, como posibles fuentes de la infección. El análisis de aspectos patogenéticos de



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

la infección en diferentes especies de mamíferos puede facilitar la localización de posibles rutas de infección y órganos objetivo en humanos.

### **2.1. INFECCIÓN Y PATOGÉNESIS EN HUMANOS**

Las pandemias de 1957 y 1968 de influenza humana surgieron tras la recombinación del virus de la influenza humana circulante y el virus aviar. Hasta hace poco, no se había tenido en cuenta la capacidad de los virus de IAAP de infectar directamente a mamíferos. Sin embargo, durante la última década, 3 subtipos diferentes de virus de IAAP, el H5N1, el H7N3 y el H7N7, se han aislado de humanos. Estos virus se identificaron como virus de influenza aviar en su totalidad y las pruebas epidemiológicas han demostrado que se habían transmitido directamente de las aves a los humanos. El H5N1 ha causado muchos casos de enfermedad grave y de muerte, mientras que los subtipos H7 están principalmente asociados a la conjuntivitis. Por tanto, puede considerarse que estos virus plantean una auténtica amenaza zoonótica. Los casos confirmados de enfermedad y la seropositividad están directamente vinculados a brotes de enfermedad en aves causados por ciertas cepas de virus de IAAP, como por ejemplo la H7N7, la H7N3, la H5N1, y no por otras como la H7N1 y la H5N2, lo cual indica que algunos subtipos de virus cruzan la barrera interespecífica con más facilidad que otros (Hayden y Croisier 2005) Los casos más graves se han encontrado con H5N1. La presencia de las zoonosis ha de ser analizada teniendo en cuenta las circunstancias: un gran número de personas quedaron expuestas a millones de aves infectadas, y el resultado fue un número limitado de casos de infección.

El brote de H7N7 en aves en los Países bajos tuvo como resultado infecciones en 86 personas que manipularon aves infectadas y en 3 miembros de sus familias, incluida una muerte. Las infecciones clínicamente aparentes debidas a este subtipo de H7 normalmente implicaban una conjuntivitis con una carga mayor de virus en el ojo que en la faringe (Koopmans et al. 2004) hecho que hace pensar que el ojo o la nariz eran los puntos de entrada inicial del virus.

Con el H5N1, se dieron más de 156 casos de infecciones y 86 muertes en humanos en el sudeste de Asia (Organización Mundial de la Salud). Muy recientemente, se registraron 12 casos en Turquía, entre ellos 4 muertes, y una persona murió por H5N1 en Irak. Estos casos de infección y la mortalidad relativamente alta han suscitado mucha preocupación. La enfermedad y las infecciones en humanos han tenido lugar principalmente tras un contacto cercano con pollos infectados vivos, moribundos o muertos (Hayden y Croisier 2005) Los mayores riesgos estaban asociados al sacrificio, desplume, despiece y preparación de las aves infectadas para el consumo. El contacto normalmente tenía lugar en la semana anterior a la aparición de los síntomas clínicos (de Jong y Hien 2006). Se considera que la inhalación de gotitas infecciosas y la autoinoculación de las mucosas de la conjuntiva o del tracto respiratorio superior son las vías de infección más corrientes. La exposición a heces de pollo en zonas de cría al aire libre también se ha propuesto como una fuente de infección. No se ha identificado ningún riesgo importante relacionado con los viajes a países con aves infectadas o con el consumo de productos de volatería. Sin embargo, en el 33% de los pacientes infectados con H5N1 en Vietnam no existía prueba de la exposición directa a las aves o se desconocía la fuente de la infección (Horby, comunicación personal) Esto permite formular conjeturas sobre la existencia de otros modos de entrada de los virus en los humanos aparte de las rutas respiratoria y conjuntivales. Se han sugerido como posibles vías el consumo de tejidos comestibles de aves infectadas y el contacto oral con agua contaminada.



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

Dos casos confirmados de infección por H5N1 en humanos en Vietnam ocurrieron poco después del consumo de un conocido plato (tiet canh), un pudding de sangre de pato cruda (Horby 2005). Un paciente en Tailandia desarrolló diarrea como síntoma inicial (Apisarnthanarak 2004). La diarrea también fue una de las características de 7 de los 10 casos de pacientes infectados por H5N1 en Vietnam objeto de un cuidadoso estudio (Tran et al. 2004). Otro caso mortal de infección por H5N1 en Vietnam desarrolló diarrea grave y posible afectación intestinal (de Jong y Hien 2006). En este último caso, la investigación epidemiológica no reveló exposición a aves enfermas, pero el paciente había nadado con regularidad en un canal habitado por patos, y el agua de dicho canal se había propuesto como posible fuente de infección. Aunque existía la posibilidad de que se hubiera ingerido oralmente agua contaminada en el baño o al nadar, y que la entrada oral de virus hubiera tenido como resultado la infección y la enfermedad, no se excluye que el virus se hubiera introducido por vía intranasal o a través de los tejidos conjuntivales.

Así, surgen dudas en cuanto a si algunas infecciones se han iniciado a través de agua o alimentos portadores de virus, al consumirlos crudos, y por tanto tras la entrada oral. Las principales preguntas son si la entrada oral puede servir de ruta de entrada para el virus y si los tejidos gastrointestinales pueden actuar como puntos de replicación, una vez que los virus han alcanzado el tracto entérico.

En este apartado de la monografía, se aportará la información más importante sobre infecciones en humanos y mamíferos por H5N1, con especial hincapié en la patogénesis y la entrada oral del virus. Merece la pena mencionar que los tropismos de los tejidos y la patogénesis de la infección por H5N1 de influenza en humanos no están bien definidos.

En todos los casos de infección humana con virus de influenza aviar altamente patógena H5N1 en el Sudeste de Asia, los pulmones eran claramente el principal punto de replicación de los virus y la patología vírica (Uiprasertkul et al. 2005). La mayoría de los pacientes murieron debido a un grave síndrome de dificultad respiratoria seguido de un fallo en múltiples órganos pero, a diferencia del caso de las aves, no existe una prueba definitiva de una infección sistémica en humanos. En el caso de la infección mortal por H5N1 de un chico en Tailandia, el ARNm vírico de cadena positiva, no sólo se detectó en el pulmón, sino también en el intestino grueso y en el delgado, lo cual hacía pensar en una infección vírica productiva del tracto gastrointestinal (Uiprasertkul et al. 2005). No se encontró ARN vírico en el plasma ni en las glándulas adrenales, ni tampoco en el cerebro, la médula ósea, los riñones, el hígado o el páncreas. El bazo únicamente contenía ARN genómico de cadena negativa, pero no contenía ARN mensajero de cadena positiva, con lo que quedaba demostrado que no se había producido la replicación del virus de la influenza. Por otro lado, el análisis de los intestinos no reveló que hubiera células con resultado positivo para antígenos víricos ni cambios histopatológicos, y el paciente tampoco desarrolló diarrea. En los pulmones, se encontraban neumocitos tipo II con resultado positivo para antígenos víricos, y se observaron lesiones características como un daño alveolar difuso, neumonía intersticial, hemorragia focal y bronquiolitis.

Dos casos mortales de Vietnam por infección de H5N1 se presentaron con diarrea grave y encefalitis sin dificultades respiratorias (de Jong et al. 2005). Sólo uno de los pacientes fue



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

examinado virológicamente, y el virus se aisló de hisopos de la garganta y rectales, del suero sanguíneo y del líquido cefalorraquídeo.

Algunos de los datos sugieren que el tracto gastrointestinal podría ser otro de los puntos de replicación viral de H5N1 en humanos. Sin embargo, cabe mencionar que las células intestinales con resultado positivo para antígenos víricos no se han revelado en los intestinos humanos. La prueba definitiva de la replicación del virus H5N1 en los intestinos de los humanos está, por tanto, todavía pendiente a pesar de la detección de ácido nucleico viral mediante RCP-RT. La detección de ARN vírico en muestras intestinales podría ser un indicio de replicación vírica local o también pueden ser el resultado de la deglución de virus como resultado de la infección de garganta.

Aunque la infección del tracto gastrointestinal es un hallazgo constante en diferentes especies de aves, nunca se ha confirmado virológicamente en las infecciones de influenza clásica en humanos. Tampoco se ha demostrado afectación intestinal en infecciones naturales y experimentales de cerdos y caballos con los virus de influenza específicos de su especie,. Los huéspedes no naturales, sin embargo, pueden desarrollar afectación intestinal tras la infección experimental con virus de influenza. Este asunto se analizará más tarde.

Con la información anterior como base, el papel del tracto intestinal como posible vía de entrada o punto de replicación del virus H5N1 sigue siendo incierto. El hecho de que la entrada oral del virus H5N1 fuera capaz de iniciar la infección, no significa necesariamente que el tracto gastrointestinal inferior se vea afectado. Los virus ingeridos con alimentos pueden usar los tejidos del tracto respiratorio superior y el orofaríngeo como vías de entrada, más que el tracto gastrointestinal inferior mismo. En humanos infectados por H5N1, los hisopos faríngeos pueden suponer cargas virales mayores que los hisopos nasales. Esto contrasta con los hallazgos realizados durante las infecciones del virus normal de influenza humana. Esto indica que la orofaringe puede ser un importante tejido objetivo para el H5N1 (Beigel et al. 2005, de Jong et al. 2005). Es por tanto posible que el inicio de la infección vírica tras la entrada oral del virus se deba a una infección de garganta y no a una infección gastrointestinal primaria. Si los tejidos intestinales pudieran permitir la replicación de los virus activos, la invasión gastrointestinal podría haber sido el resultado de una viremia, considerando que el virus infeccioso H5N1 o el ARN vírico se han descubierto en el suero sanguíneo de algunos pacientes (Beigel et al 2005, de Jong et al. 2005).

En suma, no existe prueba suficiente en el caso de los humanos para afirmar que si el virus H5N1 alcanzara el lumen intestinal después de su entrada oral o tras el consumo de alimentos contaminados o infectados podría iniciar la infección a través de los intestinos o podría realmente replicarse en los tejidos del intestino.

### **2.2. INFECCIÓN Y PATOGÉNESIS DE MAMÍFEROS DIFERENTES DE LOS HUMANOS**

Las infecciones naturales y experimentales con virus de influenza aviar, especialmente con el H5N1, han tenido lugar en varias especies de mamíferos diferentes de los humanos, y estos estudios han generado algunas aproximaciones a la patogénesis de estos huéspedes no naturales. Se usaron diferentes vías de inoculación. Aunque existe las respuestas de las diferentes especies de mamíferos a dicha inoculación son muy variadas, algunos hallazgos



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

pueden ser relevantes por lo que respecta a la patogénesis de H5N1 en humanos. Debido a que el presente documento se refiere principalmente a la entrada oral o la afectación gastrointestinal, va a prestarse especial atención a estos puntos en las diferentes especies de mamíferos.

### **2.2.1. Infección natural**

En zoos tailandeses se alimentó a tigres y leopardos con canales de pollo infectado crudo procedentes de un matadero local, lo que dio pie a varios brotes de enfermedades respiratorias y provocó muertes (Keawcharoen et al. 2004, Thanawongnuwech et al. 2005). Esto sucedió en una época en la que muchos pollos de la zona estaban muriendo por enfermedad respiratoria y con síntomas neurológicos debidos al virus H5N1. Estas especies felinas mostraron un curso generalizado de la enfermedad y lesiones que aparecieron en los pulmones, el corazón, el timo, el estómago, los intestinos, el hígado, los nódulos linfáticos y el cerebro. La replicación del virus se mostró en el epitelio bronquiolar, hepatocitos y neuronas. Entre los síntomas clínicos estaban la fiebre, la deficiencia respiratoria y los síntomas neurológicos. Estas observaciones demostraron que la infección por virus H5N1 puede tener lugar tras la ingesta oral de canales de aves contaminadas. El punto de entrada del virus tras ingesta oral del virus H5N1 en tigres y leopardos no se determinó y no se llevaron a cabo exámenes virológicos de los intestinos. Los autores sugirieron que la tinción positiva para la nucleoproteína vírica en hepatocitos puede haber sido consecuencia de una fuerte carga viral que pase a través del tracto digestivo tras haber consumido los canales (Thanawongnuwech et al. 2005). La afectación del hígado como parte del tracto digestivo, sin embargo, podría deberse a la infección orofaríngea o respiratoria, seguida de una generalización de la infección, y no el comienzo en el mismo tracto intestinal.

Recientemente se han confirmado los casos de infección natural por virus H5N1 altamente patógeno, probablemente como consecuencia de una alimentación con aves infectadas, en 3 gatos y en una garduña en Alemania (OMS) [http://www.who.int/csr/don/2006\\_03\\_09a/es/index.html](http://www.who.int/csr/don/2006_03_09a/es/index.html).

Los cerdos también son susceptibles al virus de influenza aviar H5N1 por naturaleza. Se encontraron pruebas serológicas de infección por H5N1 en una población muy pequeña de cerdos (8 de 3175 cerdos analizados, o 0,25%) en Vietnam en 2004, donde el H5N1 había atacado con más dureza, y no se realizaron pruebas virológicas (Choi et al. 2005).

Durante la epidemia de IAAP en aves en los Países Bajos en 2003, el virus causante, H7N7, también se introdujo en la población de cerdos (Loeffen et al. 2004). Los anticuerpos del H7N7 se encontraron en 13 de 46 rebaños mixtos de cerdos y aves infectadas, pero no en rebaños mixtos donde las aves se hubieran desechado como medida preventiva ni en piaras sin aves. En uno de los rebaños infectados, el ganadero había estado alimentando con huevos rotos a los cerdos, lo cual hacía pensar que los cerdos podían haberse infectado a través de los alimentos contaminados. Sin embargo, el virus no fue capaz de establecerse en la población de cerdos una vez retirada la fuente de la infección (es decir, las aves infectadas)

### **2.2.2. Inoculación experimental**

Inoculaciones orales



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

La infección de 3 gatos domésticos se provocó experimentalmente mediante la ingesta oral de canales de pollo que habían sido inoculados con el virus H5N1 24 horas antes (Rimmelzwaan et al. 2006). En los 3 gatos, el virus se replicó no sólo en el tracto respiratorio, sino también en múltiples tejidos fuera del aparato respiratorio, incluido el sistema nervioso central. Se observaron una expresión del antígeno vírico y una ganglioneuritis asociada a virus en el plexo submucoso y el plexo mientérico en el duodeno y el íleo. El virus se detectó de forma consistente y con títulos muy altos en los hisopos faríngeos y nasales, pero resultaron ser muy variables en los hisopos rectales. El estudio demostró que la infección por H5N1 en felinos podía establecerse a través de la entrada oral, pero no se pudo determinar si la infección se había iniciado en los tejidos orofaríngeos o en los gastrointestinales. Los autores sugirieron que las lesiones encontradas en el plexo neural de Meisner y Auerbach podían reflejar la entrada del virus a través del lumen intestinal. Esta sugerencia se realizó porque los plexos mientéricos no se vieron afectados en los gatos que, en un experimento similar, habían sido inoculados por vía intratraqueal con la misma cepa de virus. Se propuso la teoría de la entrada del virus a través de las terminaciones nerviosas del intestino, un mecanismo que, según se demostró, suele darse con el tipo 1 del virus Herpes simplex (Geeser y Koo, 1996), aunque también se consideraron otras rutas de entrada. El neurotropismo observado con el virus H5N1 en gatos era sorprendente y habrán de tenerse en cuenta las rutas neuronales de expansión y propagación del virus, de cara al análisis posterior de ratones y hurones inoculados con H5N1.

### Inoculaciones intranasales e intratraqueales

Se llevaron a cabo inoculaciones del virus H5N1 por vía intratraqueal mediante el uso de un catéter en 3 gatos como parte de los experimentos con gatos inoculados oralmente mencionados anteriormente (Kuiken et al. 2004, Rimmelzwaan et al. 2006). Estos gatos mostraron síntomas clínicos similares a los de los gatos que habían sido alimentados oralmente con canales de pollo infectado. Se encontraron lesiones en el tracto respiratorio y en tejidos fuera del aparato respiratorio, incluido el cerebro, aunque no en los plexos intestinales. Se aisló el virus de diferentes órganos internos analizados, con lo que se demostró que la infección tenía un carácter generalizado. En estos gatos, el virus infeccioso era fácilmente detectado en los hisopos faríngeos y nasales, al igual que en los rectales, aunque los últimos obtenían resultados positivos con menos frecuencia y el virus estaban presente con títulos más bajos. Este experimento también demostró que el virus altamente patógeno H5N1 era más patógeno en los gatos que otros virus de influenza, ya que recientes experimentos en los que se había realizado la inoculación de gatos con virus de IABP habían tenido como resultado excreciones de virus pasajeras sin síntomas clínicos (Hinshaw et al. 1981), mientras que la cepa del virus H3N2 en humanos no había provocado infecciones (Kuiken et al. 2004).

En un estudio experimental limitado, las inoculaciones intranasales de cerdos con virus H5N1 de Asia de 2004 tuvieron como resultado el aislamiento del virus del tracto respiratorio (amígdalas, tráquea y pulmones) pero no de los intestinos (Choi et al. 2004). También se aislaron virus del hígado de 2 cerdos de 4, a pesar de la ausencia de viremias detectables o de virus en el bazo y los riñones. Aunque este experimento confirmó la susceptibilidad de los cerdos al H5N1, no se produjo transmisión del virus entre los cerdos inoculados experimentalmente y los que se contagiaron por contacto.



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

Los hurones son famosos por ser naturalmente susceptibles a la infección por virus de influenza humana, así como a algunos virus de influenza porcina, equina y aviar, y se usan con frecuencia en los modelos de influenza. Los hurones fueron inoculados por vía intranasal con virus H5N1 aislados en Hong Kong en 1997 (Zitzow et al. 2002) y en otros países del Sudeste asiático en 2003 y 2004 (Govorkova et al. 2005, Maines et al. 2005). Los aislamientos de H5N1 de humanos pueden provocar enfermedades respiratorias, fiebre, letargia y pérdida de peso más graves que los virus corrientes de influenza humana H3N2. También se aprecian diarrea y síntomas neurológicos tras la exposición a aislamientos de H5N1 y muchas infecciones fueron mortales. Los aislamientos de H5N1 de origen humano provocaron una infección sistémica en los hurones, con altos títulos virales en sangre, en el bazo y el hígado. Sólo hubo algunos aislamientos del H5N1 del intestino con títulos virales que eran al menos 100 o 1000 veces inferiores a los del tracto respiratorio. Los exámenes histopatológicos mostraron una infiltración celular mononuclear en el tabique interalveolar de los pulmones y en las meninges, el plexo coroideo y el parénquima cerebral. Las células con resultado positivo para antígenos víricos sólo se encontraban en los alveolos y bronquiolos de los pulmones y en las neuronas de las zonas del cerebro donde apareció inflamación, pero no en los intestinos, a pesar de la presencia de diarrea en algunos hurones. Aunque los virus H5N1 humanos tenían un neurotropismo obvio, también se aisló el virus de los cerebros de los hurones inoculados con virus normales de influenza humana H3N2, que no se extienden más allá del tracto respiratorio en humanos y no causaron síntomas neurológicos en los hurones. Debido a que los títulos virales de influenza en el bulbo olfatorio de hurones llegaron pronto al máximo de infección, los autores sugieren que el virus alcanza el sistema nervioso central a través de los nervios olfatorios y el seno etmoidal tras la inoculación intranasal. El virus H5N1 también se aisló del cerebro de hurones sin viremia detectable ni replicación en órganos internos, de forma que no es probable que el virus alcance el sistema nervioso a través de la circulación. Algunos episodios patógenos en estos hurones inoculados con H5N1 recuerdan al caso de los gatos, especialmente en cuanto a la afectación de órganos fuera del sistema respiratorio y al marcado carácter neurotrópico. Cabe mencionar que la afectación del sistema nervioso central también se registró en 2 casos de humanos de H5N1 (de Jong et al. 2005). A diferencia de los virus H5N1 obtenidos de humanos, los aislamientos aviares de H5N1 provocaron sólo enfermedades leves en hurones y se replicaron sólo en el tracto respiratorio.

La mayoría de los estudios experimentales sobre infecciones con H5N1 se han realizado en ratones BALB/c. Los virus H5N1 aislados de humanos en Hong Kong en 1997 mostraban dos fenotipos distintos en ratones (Gao et al., Lu et al. 1999). Algunos virus eran de baja patogenicidad: se replicaban exclusivamente en el tracto respiratorio, no eran normalmente letales y los animales los eliminaban 6 o 9 días después de la inoculación. Otros virus eran altamente patógenos: se replicaban en múltiples órganos además del tracto respiratorio y eran causa de mortalidad en el modelo en ratones. La mayoría de los aislamientos de 2003 y 2004, a diferencia de los aislamientos aviares, eran también altamente patógenos en ratones (Maines et al. 2005). Uno de dichos virus altamente patógenos se aisló del colon de unos ratones infectados con un título viral menos elevado (102.5 PFU por gramo) (Gao et al 1999). En otro estudio sobre la infección en ratones con aislamientos de H5N1 similares, el estómago, duodeno y el intestino grueso dieron negativo en la prueba de células con resultado positivo para antígenos víricos de influenza. 2000). Es muy obvio, en cualquier caso, que el tracto



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

respiratorio y el sistema nervioso son los principales puntos de replicación del H5N1 en ratones. Según algunos estudios, la viremia tiene poca probabilidad de contribuir a la propagación del virus a otros órganos en ratones, lo cual es totalmente diferente en el caso de los pollos (Tanaka et al. 2003, Nishimura et al. 2000). Se descubrió que uno de los aislamientos de Hong Kong/97 (H5N1) se reproducía primero en células epiteliales de la mucosa nasal, los bronquios y los alveolos; a partir de ese momento, parecía que se expandía a través de las ramas del nervio vago y/o del nervio trigémino hasta el tallo encefálico y después a la corteza cerebral (Tanaka et al. 2003). La transmisión del virus al sistema nervioso central también puede depender de la dosis de virus, ya que el aislamiento de H5N1 de Hong Kong/97 menos virulento se tomó del cerebro tras la inoculación intranasal con una elevada dosis pero no con una dosis de virus inferior.

### Múltiples puntos de inoculación

Los macacos están considerados como uno de los modelos de animales de mayor fiabilidad para estudiar la patogénesis de influenza en humanos. En los estudios experimentales de infecciones, los macacos cangrejeros fueron inoculados con el aislamiento de H5N1 humano de Hong Kong/97 por vía intratraqueal y orofaríngea y a través de las rutas de inoculación intraconjuntival (Rimmelzwaan et al. 2001, Kuiken et al. 2003). Los síntomas clínicos de la infección de H5N1 en macacos - fiebre y deficiencia respiratoria aguda - recordaban a los humanos y eran más graves que los que se observaron con el virus de influenza humana H3N2 normal. A diferencia de los gatos, los ratones o los hurones, los síntomas neurológicos o gastrointestinales no se produjeron en los macacos inoculados con H5N1. Otra diferencia con respecto a la situación de los gatos, los ratones y los hurones, era la falta de pruebas de la replicación de H5N1 fuera del tracto respiratorio. Los pulmones eran claramente los principales puntos de replicación del virus H5N1. Se observó la disfunción de múltiples órganos sin pruebas de replicación de virus en el cerebro, el bazo, el hígado o los riñones, lo que se debía posiblemente al daño alveolar difuso y a la deficiencia respiratoria aguda. Hasta la fecha, no se han registrado investigaciones sobre si el H5N1 se puede replicar en los intestinos de los macacos.

### 2.3. CONCLUSIONES

Ha tenido lugar la infección de humanos con los subtipos H5N1 y H7N7 del virus de IAAP. La mayoría de los casos humanos se dan con contacto cercano con aves infectadas y la infección posiblemente ocurre mediante vía conjuntiva o tejidos del tracto respiratorio superior. Sin embargo, la posibilidad de que el tracto gastrointestinal sea otro punto de entrada, de replicación y de excreción viral, especialmente con el virus H5N1, no puede excluirse. La entrada oral de H5N1 ha provocado la infección en gatos y tigres pero la vía de entrada del virus - la orofaringe, los tejidos del tracto respiratorio superior o el tracto intestinal - está analizándose. En casos humanos mortales de influenza aviar por H5N1, el ARN replicante vírico se encontró en los intestinos por RCP-RT y se encontró virus infeccioso en los hisopos rectales. Sin embargo, este ARN replicante puede haberse reproducido en los tejidos orofaríngeos o respiratorios y después haber sido deglutido, y puede no haberse originado a partir de la replicación en el tracto gastrointestinal mismo.

Los virus pueden haber alcanzado los plexos intestinales de gatos inoculados oralmente a través del lumen intestinal, pero también es posible que se hayan extendido a través de la ruta



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

neural. Se sabe que hay otro virus, el virus de la encefalitis hemaglutinante porcina, que pertenece a la familia de los virus corona, afecta a los mismos plexos. Los estudios sobre patogénesis demostraron que los plexos intestinales de los cerdos se vieron afectados tras la replicación en las células epiteliales intestinales y en los ganglios sensoriales locales, y después, el virus se extiende a la médula espinal (Andries y Pensaert 1980) El tropismo neurales del virus H5N1 se ha mostrado en varios mamíferos inoculados de manera experimental como gatos, hurones y ratones, y también se ha confirmado el caso de un humano en Vietnam. Existe, por tanto, la posibilidad de que los virus H5N1 puedan tener características neurotrópicas en diferentes mamíferos y que la entrada y la extensión en el organismo se produzcan a través de los nervios. La extensión neural de H5N1 se mostró en ratones (Tanaka et al 2003), mientras que la entrada a través de las terminaciones nerviosas del intestino se propuso como teoría en el caso de los gatos (Rimmelzwaan et al, 2006). La entrada de virus a través de terminaciones nerviosas y células neuroepiteliales y la invasión del organismo a través de los nervios a veces se ha denominado Alphaherpesvirinae (Mettenleiter 2003).

### **2.4. INFORMACIÓN CIENTÍFICA PENDIENTE**

La patogénesis de los virus de IAAP en humanos, en especial en relación con el tracto gastrointestinal como posible vía de entrada y punto de replicación, necesita seguir estudiándose. Las características pueden variar entre una especie de mamíferos y otra y de una cepa a otra. Desde los puntos de vista de la sanidad pública y la seguridad alimentaria, es muy importante saber si el consumo de alimentos crudos que contengan el virus de IAAP puede desembocar en la infección de humanos y, si fuera así, cómo y en qué condiciones. Esta información será útil y definirá qué precauciones son necesarias o prescindibles a la hora de consumir productos de volatería en zonas infectadas o procedentes de las mismas. Es necesario determinar si el comienzo de la infección tras la entrada oral del virus ocurre a través de los tejidos del tracto respiratorio superior, orofaríngeo y/o gastrointestinal, y qué tipo de células pueden actuar como rutas de entrada para virus de IAAP. Se necesitan modelos animales en los que los casos de patogénesis recuerden a los de los humanos. Los estudios detallados de las infecciones en gatos, en los se usen diferentes aproximaciones a las inoculaciones (p.ej. directamente en el estómago o en el lumen intestinal) podrían ser de gran utilidad a nivel informativo. Es necesario establecer si la afectación intestinal tiene lugar al principio de la infección, o simplemente resulta de una propagación generalizada del virus en diferentes tipos de tejidos de los órganos.

Es necesario prestar más atención a los neurotropismos de H5N1 en diferentes mamíferos, incluidos los felinos y los ratones, y a la posibilidad de que las terminaciones nerviosas o las células neuroepiteliales actúen como vía de entrada en humanos. Así, se obtendría una explicación para la excepcionalmente baja frecuencia con la que la transmisión directa de H5N1 ocurre en humanos.



Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

### **3. FACTORES DE VIRUS Y DE HUÉSPEDES QUE POSIBLEMENTE INTERVENGAN EN LAS INFECCIONES EN HUMANOS (CON REFERENCIA AL TRACTO GASTROINTESTINAL)**

Durante mucho tiempo se pensó que la falta de receptores adecuados de los virus de influenza aviar en las células de los mamíferos restringía su capacidad para infectar a los humanos. Aparte de los receptores huéspedes y los puntos de unión al receptor del virus, otras características genéticas de los virus también determinarán la posibilidad de que los virus aviares se repliquen en mamíferos. Estos aspectos se discutirán en este apartado.

Si un virus de influenza aviar alcanzara el tracto gastrointestinal humano, estaría expuesto a numerosas condiciones adversas en el estómago y los intestinos que podrían afectar a la infecciosidad del virus. Si el tracto gastrointestinal actuara como una posible vía de entrada, haría falta que los alimentos contuvieran grandes cantidades de virus para poder alcanzar la mínima dosis infecciosa. Se analizarán algunos de los factores que repercuten en el futuro del virus de influenza aviar en los alimentos tras su consumo.

#### **3.1 RECEPTORES DEL VIRUS DE INFLUENZA Y PUNTOS DE UNIÓN AL RECEPTOR**

Se da por sentado que la especificidad del huésped de los virus de influenza está controlada por una variedad de genes víricos y sus interacciones y su papel en los diferentes entornos celulares (Zambon, 2001).

La HA media en la unión de un virus de influenza al receptor en una célula huésped, mientras que la NA rompe la unión entre la HA y su receptor, lo cual es necesario para la liberación de las partículas de la progenie del virus. La combinación de la especificidad de los receptores víricos de la HA y la especificidad de escisión de la NA es, por tanto, importante para la especificidad del huésped, el tropismo de los tejidos y la virulencia de un virus de influenza.

El receptor del virus de influenza consiste en ácido siálico unido a la galactosa. Los virus de influenza reconocen dos tipos de ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico y ácido N-glicolilneuramínico) que están unidos a la galactosa por un enlace de -2,3 o de -2,6 (comentado por Suzuki, 2005) La capacidad que tiene un virus de influenza para replicarse en ciertas especies de huéspedes recibe la influencia del ácido siálico, de los tipos de enlaces en dichos huéspedes y del punto de unión al receptor de la HA vírica. Las células epiteliales del intestino del pato, por ejemplo, indican principalmente un ácido siálico con un enlace de

2,3 y los virus de influenza aislados de aves acuáticas poseen HA con una alta afinidad a este tipo de azúcar (Ito et al. 1998). Por el contrario, los ácidos siálicos con un enlace de 2,6 predominan en el tracto respiratorio humano (Baum y Paulson 1990) y los virus de influenza que circulan en los humanos favorecen la unión con este tipo de ácido siálico (Connor et al. 1994). Se ha demostrado que las pequeñas mutaciones que se producen en los puntos de unión de la HA, especialmente en los aminoácidos 226 y 228, causan un cambio en la especificidad del receptor de los enlaces siálicos de 2-6 a 2-3 y viceversa (comentado por Suzuki 2005). Ambos tipos de receptores se han registrado en la tráquea de cerdos y su presencia respalda la posibilidad de que los cerdos sean susceptibles a los virus de influenza tanto aviar como humana (Ito et al. 1998).



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

Hay estudios *in vitro* recientes sobre las células epiteliales de las vías respiratorias humanas primarias que han cambiado de algún modo nuestra manera de entender la interacción entre los ácidos siálicos y los virus de influenza (Matrosovich et al. 2004). Un primer hallazgo sorprendente fue que estas células contenían ambos tipos de receptores, con enlaces de 2-6 que se encontraban principalmente en células no ciliadas y de enlaces de 2-3 que se encontraban principalmente en células ciliadas. Esto sugiere que el enlace del ácido siálico depende de las células, y no de las especies. En segundo lugar, los virus de influenza humana (H3N2) y aviar (H5N1) podían replicarse en estas células epiteliales de las vías respiratorias humanas diferenciadas. Durante el primer ciclo de replicación vírica, los virus de los humanos infectaban preferentemente células no ciliadas y los virus aviares infectaban principalmente células ciliadas, lo cual se corresponde con la expresión de los tipos correspondientes de receptores de ácido siálico. En ciclos posteriores de replicación vírica, el virus humano, pero no el aviar, infectaba tanto las células ciliadas como las no ciliadas. La mayoría de los virus aviares H5N1 que se aislaron de humanos en el Sudeste asiático tenían una especificidad de receptores del tipo virus aviar (Matrosovich et al. 1999), lo cual demuestra que las transmisiones de aves a humanos pueden ocurrir a pesar de la predominancia de receptores humanos en las personas. Estos datos demuestran que el papel especial de los puntos de unión al receptor como barrera para la replicación de virus de influenza aviar en humanos se simplifica a veces demasiado.

Los virus H5N1 que no tenían diferencias en su punto de unión al receptor diferían en gran medida tanto en su capacidad de replicarse como en su eficacia en el modelo en hurones (Govorkova et al. 2005). Este hallazgo demuestra que hay otros factores aparte de la especificidad del receptor de HA que pueden restringir la infección de los mamíferos con virus de influenza aviar.

Debido al hecho de que al tracto respiratorio se le considera el principal objetivo de la replicación del virus de influenza en los mamíferos, los estudios sobre receptores se han llevado a cabo exclusivamente en este sistema de órganos. Por tanto, no existe información sobre los tipos de receptores y la capacidad de los virus de influenza aviar para replicarse en el tracto intestinal de los mamíferos.

### **3.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS Y CONFIGURACIÓN GENÉTICA**

La constelación genética de los virus de influenza también puede desempeñar un papel muy importante en su capacidad de cruzar la barrera interespecífica. El primer virus de influenza H5N1 que infectó a humanos en Hong Kong en 1997 parecía estar recombinado con el gen de la HA procedente de los gansos de Guangdong del 96 y otros genes de diferentes virus de influenza aviar (no H5) (Webster et al. 2002). Los virus de Hong Kong del 97 (H5N1) se eliminaron rápidamente gracias al deshecho de millones de aves, pero sus precursores persistieron en los gansos del sur de China. Los virus de influenza altamente patógena H5N1 llevan circulando en gansos salvajes en China desde 1996 y han atravesado numerosos episodios de recombinación en los que han adquirido nuevos genes internos en diferentes combinaciones con virus de influenza circulantes en aves acuáticas (Sims et al. 2005). A partir de 2001, los virus H5N1 no sólo se aislaban de aves acuáticas sino también de aves terrestres. Se identificaron siete genotipos diferentes de H5N1 en aves terrestres en 2001 y otros 5 genotipos en 2002. Comparados con el virus original del ganso en Guangdong en el 96, la mayoría de los genotipos tenían deleciones en el tallo de la neuraminidasa (NA) y en la



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

proteína NS1 no estructural. El denominado genotipo “Z”, que contiene ambas deleciones, se ha vuelto el dominante en aves acuáticas y terrestres desde su aparición en 2002. Los aislamientos de H5N1 de humanos desde 2003 y 2004 tenían la misma constelación genética que el genotipo Z, pero les faltaba la deleción del tallo de la NA y se les asignó el genotipo “Z+”.

Es necesario admitir que, desde 2004, los aislamientos de H5N1 han infectado al mayor número de humanos que se conoce, así como a félidos y cerdos. Algunos creen, por tanto, que la evolución de los virus H5N1 ha estado asociada en los últimos años con el aumento de la transmisibilidad a los humanos. Por otro lado, es necesario tener en cuenta que el aumento del número de infecciones humanas puede simplemente reflejar una exposición más frecuente y más amplia, debido a las grandes epidemias que han tenido lugar en aves desde 2003, y que no existe una prueba de que se haya dado un aumento de la capacidad de los virus para replicarse en mamíferos entre 1997 y la actualidad. En suma, los determinantes moleculares de la transmisión de H5N1 a los humanos siguen siendo inciertos, al igual que la eficacia de la replicación en células humanas, incluidas las del intestino.

### 3.3 FACTORES QUE INCIDEN EN LAS INTERACCIONES HUÉSPED-VIRUS

#### 3.3.1. *Algunas consideraciones*

En términos generales, la transmisión directa del H5N1 a los humanos debe seguir considerándose un hecho excepcional ya que el número de infecciones humanas confirmadas es inferior a 200 y por tanto todavía baja en relación con la amplia población que ha estado expuesta a millones de aves infectadas. Los factores que permiten que el virus comience la infección en algunos humanos y no en otros siguen siendo inciertos. El número relativamente alto de casos en niños y jóvenes adultos sanos plantea la cuestión sobre los posibles factores huésped o las circunstancias que permiten la entrada excepcional de virus y el cruce de la barrera interespecífica. Surge la duda de si la configuración genética de los virus (o de algunos aislamientos de la población viral) ha cambiado para facilitar la invasión de los virus en el cuerpo humano.

Prácticamente todos los casos de humanos estudiados hasta la fecha indican que el tracto gastrointestinal y el orofaríngeo pueden ser la vía de entrada y el principal punto de replicación. Si, sin embargo, las células de estas superficies mucosas fácilmente accesibles fueran totalmente susceptibles a los virus, tendrían lugar más infecciones humanas. Es posible que no existan más rutas de entrada ni más células objetivo que las tradicionalmente conocidas, o que el virus pueda entrar a través de un punto objetivo o tipo de célula objetivo aún por descubrir. El tracto gastrointestinal se ha planteado como una posible vía de entrada tras la ingesta de alimentos contaminados, aunque no existe una clara prueba de la replicación de los virus en este sistema de órganos. Ha de tenerse en cuenta que, al tener lugar la ingesta de virus, no se puede evitar el contacto con los tejidos del tracto orofaríngeo y respiratorio superior, y que esos tejidos pueden actuar como puntos de entrada.

Resulta interesante el hallazgo de afectación intestinal en algunas especies de mamíferos. En los gatos, los plexos nerviosos de las paredes de los intestinos se vieron infectados tras la administración oral de H5N1 y se propuso la entrada de virus a través de las terminaciones



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

nerviosas en el lumen intestinal, un mecanismo de entrada ya descrito para el tipo 1 del virus Herpes simplex (Gesser y Koo 1996). Parece obvio que el virus H5N1 demuestra características neurotrópicas en diferentes especies de mamíferos, mientras que sólo existe un caso registrado de H5N1 asociado a la encefalitis en humanos (de Jong et al. 2005). Un estudio realizado en ratones demostró que el H5N1 se replicaba en los tejidos respiratorios, ascendía al tallo encefálico a través del nervio vago y el trigémino, pero no a través de la sangre, para luego extenderse por otras zonas del cerebro (Tanaka et al. 2003). Por supuesto, hay que tener cuidado a la hora de extrapolar las características patogénicas de los virus H5N1 en ratones a los humanos. Sin embargo, las variantes neurotrópicas de H5N1 fueron seleccionadas rápidamente tras la atenuación del virus en los ratones y ha de tenerse en cuenta la posibilidad de una selección rápida similar de las variantes en humanos u otros mamíferos (Lipatov et al 2003). La cuestión que se plantea es si el H5N1 en mamíferos puede usar rutas neurales para introducirse en el organismo con o sin previa replicación en células objetivo del tipo epitelial en ubicaciones mucosas. Las células neuroepiteliales situadas en el tracto respiratorio superior podrían servir para esto. Deberá estudiarse este modo de entrada potencial de virus en mamíferos y, por supuesto, en humanos.

El hecho de que la entrada de virus de influenza aviar a través de las terminaciones nerviosas pueda suceder en el intestino es bastante dudoso, teniendo en cuenta las muchas barreras que los virus deben sobrepasar para alcanzar el lumen intestinal a la vez que mantienen su infecciosidad en cantidades suficientes. Las terminaciones nerviosas y las células neuroepiteliales son más numerosas y más accesibles en el tracto orofaríngeo y respiratorio que en el sistema intestinal (Pick et al. 2005, Steven y Lowe 2005).

De cualquier modo, el hecho de que las infecciones humanas con H5N1 sean infrecuentes a pesar de la frecuente exposición en zonas altamente infectadas puede deberse a la falta de punto de replicación fácilmente accesible o de células objetivo en superficies mucosas. Otra opción es que el virus se replique en las células epiteliales del tracto respiratorio, como hacen los virus de influenza humana, pero la replicación en dichas células resulta complicada debido a ciertas condiciones desconocidas. Una posibilidad es que la mayoría de las partículas de los virus de influenza aviar no logren llevar a cabo un ciclo de replicación completo en las células epiteliales, de forma que no exista una producción de partículas infecciosas de la progenie del virus o ésta sea mínima. Esto concuerda con el hallazgo de que los aislamientos de H5N1 de humanos tienen una delección en el tallo de la NA y esa NA de tallo corto es incapaz de disgregar la progenie del virus de células infectadas. Otra posibilidad es que las proteínas de naturaleza inmune de las secreciones respiratorias prevengan la infección inicial con virus de influenza aviar en humanos. Las proteínas surfactantes pulmonares A y D y la glicoproteína 340 rica en receptores scavenger, por ejemplo, tienen virus de influenza A que neutralizan y concentran la actividad (White et al. 2005). Todavía faltan estudios sobre el efecto de estas proteínas en los virus de influenza aviar y queda por ver si ejercen efectos más potentes sobre los virus de influenza aviar o humana. Por último, no se puede excluir la posibilidad de que la inmunidad existente a los virus de influenza humanos H1N1 y H3N2 confiera una protección parcial contra la infección de humanos por H5N1. A pesar de la falta de reacción cruzada serológica entre las HA de estos virus, los anticuerpos para N1 del H1N1 y/o la inmunidad celular pueden reducir la posibilidad de infección por H5N1. Esto también podría explicar por qué los niños y los jóvenes adultos que tienen un grado de inmunidad frente a los virus de



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

influenza humana menos sólido que otras personas, son más susceptibles de ser infectados por H5N1.

### ***3.3.2. Cantidad de virus en la exposición***

La mayoría de las infecciones humanas por H5N1 ocurrieron tras un contacto cercano e intenso con especies de aves. Por tanto, existen pruebas circunstanciales de que la cantidad de virus en la exposición ha de ser superior para que se pueda establecer la infección. De nuevo, esto implica que las células objetivo o los puntos de entrada de los virus no son fácilmente alcanzables. Un virus de influenza aviar debe sobrepasar varias barreras sin identificar para infectar a los humanos. Es difícil que elevadas cantidades de un virus infeccioso alcancen el lumen intestinal tras el consumo de alimentos contaminados, considerando las numerosas condiciones adversas a las que el virus se ve expuesto en el tracto gastrointestinal. Una vez deglutido, el virus se absorberá por los tejidos del tracto digestivo superior, como los del esófago y el estómago, y se diluirá durante el proceso digestivo. Su título de infecciosidad puede verse reducido por un pH extremadamente bajo de las secreciones gástricas y los efectos de la bilis, al pasar el estómago y el duodeno respectivamente. Los efectos inhibidores de la bilis se demostraron con diferentes virus con envoltura incluido el virus de la enfermedad Newcastle (Lee y Hanson 1975). La posibilidad de que grandes cantidades de virus alcancen el lumen intestinal es por tanto bastante improbable, a menos que entren títulos virales inusualmente altos (como por ejemplo al comer pudding de sangre cruda procedente de patos virémicos) o que el virus esté protegido frente a la neutralización (como por ejemplo en el tétano de huesos ingeridos por carnívoros).

Según estos datos, se considera que la infección del tracto gastrointestinal tiene pocas probabilidades de ocurrir bajo circunstancias naturales. Aún así, no se puede obviar totalmente y se necesitan más estudios para examinar la posibilidad de replications gastrointestinales. Los gatos, hurones, ratones y posiblemente los cerdos, pueden actuar como modelos de animales útiles pero es necesario recalcar que la infección humana puede diferir en diferentes aspectos.

### ***3.3.3. Efectos de un pH bajo en virus de IA***

La labilidad ácida de los virus de influenza y la neutralización del virus por el bajo pH del estómago durante mucho tiempo se ha considerado motivo de la ausencia de replicación intestinal de virus de influenza en mamíferos. Sin embargo, 6 de los 14 virus de influenza examinados, incluidos 2 virus de IABP, se aislaron de una parte u otra del tracto intestinal de hurones que habían sido intranasalmente inoculados (Kawaoka et al. 1987). En el mismo estudio, uno de los 4 virus de influenza analizados también se aisló de las heces de ceros inoculados por vía intranasal, mientras que el yeyuno, el íleo y el colon dieron negativo.

Los estudios sobre la resistencia al ácido de los virus de influenza han obtenido de alguna forma resultados contrastados. En un estudio (Webster et al. 1978) los virus de influenza de patos eran relativamente más estables al ácido que los virus de los humanos y se afirmaba que esto les permite atravesar el ácido del pH de la molleja y replicarse en las células que cubren el tracto intestinal, que es el principal punto de replicación en diferentes especies de aves.



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

En estudios más recientes (Lu et al. 2003) 4 cepas de H7N2 se examinaron para hallar la estabilidad al ácido con pH2 y la infecciosidad se perdió en menos de 5 minutos. Otro estudio (Scholtissek 1985) demostró las grandes diferencias en la sensibilidad al pH entre los diferentes subtipos. Todas las cepas de H3 eran relativamente estables ante un pH bajo (5,1-5,4) independientemente del origen de la especie. Todas las cepas de H7 y H5 eran relativamente lábiles al pH 5,5-6,0. Las cepas H1 mostraron una sensibilidad intermedia. Los valores bajos de pH parecían haber afectado principalmente a la HA y a la NA. Es llamativo que se descubriera que la actividad de la NA de los virus de influenza aviar del subtipo H1N1 era más resistente al ácido del pH que la NA de los virus H1N1 de los cerdos o los humanos (Fiszson et al. 1989) hecho que podría explicar por qué los virus de influenza aviar mantienen su actividad funcional con niveles bajos de pH en el tracto digestivo superior.

La estabilidad al ácido de los virus de influenza aviar parece ser un asunto multifactorial en el que no solo intervendrá la cepa del virus sino también la cantidad de virus, el medio de inclusión, el valor del pH y la duración de la exposición. Por tanto es impredecible y no se puede garantizar que los virus de la influenza queden neutralizados por la exposición a un bajo nivel del pH de las secreciones gástricas tras pasar a través del estómago.

### 3.4 CONCLUSIONES

No es probable que el tracto gastrointestinal inferior (estómago e intestinos) pueda actuar como vía de entrada de los virus H5N1 en humanos tras el consumo de alimentos procedentes de animales infectados. No existen pruebas de que el virus se replique en el intestino humano o que los síntomas gastrointestinales se deban a los efectos directos de los virus en dicho órgano. Incluso si la entrada de virus en el tracto gastrointestinal fuera posible, p.ej. a través de las terminaciones nerviosas tal y como se sugirió en los gatos inoculados de manera experimental, las posibilidades de que dichas terminaciones se contaminen son muy pocas. La dosis infecciosa mínima del virus debe poder alcanzar el lumen intestinal considerando las múltiples barreras que necesita superar. La diarrea, que se presentó en algunos de los casos de H5N1 en humanos, puede no ser un síntoma específico. Igualmente, la presencia de ARN vírico o incluso de un virus infeccioso en hisopos rectales no permite concluir que el tracto gastrointestinal sea una vía de entrada o un órgano objetivo del virus H5N1. El ARN vírico o los virus infecciosos pueden haberse producido en la garganta o en los tejidos respiratorios y deglutidos, o pueden haber alcanzado el intestino tras la generalización de otros órganos objetivo infectados. Los alimentos que contienen virus pueden ser una fuente de infección si la entrada del virus tiene lugar a través de los tejidos orofaríngeos. Tampoco se puede descartar la existencia de una célula objetivo sin descubrir en el tracto intestinal. Las vías exactas de entrada del virus en los humanos no se han localizado ni identificado. Las pruebas epidemiológicas sugieren que la infección en humanos ocurre raramente y que tiene lugar particularmente tras un contacto muy directo con los animales infectados. Es por tanto probable que se necesite una alta dosis de virus para desencadenar una infección y que no exista una ruta de entrada fácilmente accesible para el virus. Se necesitan estudios experimentales sobre las rutas exactas de la entrada de virus de H5N1 en mamíferos ya que pueden dar información útil para la infección humana.

### 3.5. INFORMACIÓN CIENTÍFICA PENDIENTE



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

Parece obvio que se necesitan más investigaciones sobre la importancia de las constelaciones de genes totales y de genes específicos o productos genéticos para poder así tener una aproximación a la base molecular de la restricción de huésped de los virus de influenza H5N1.

La base patogénica para la observación de que el virus H5N1 causa infección en algunos humanos y no en otros sigue siendo desconocida. Las rutas de entrada y/o células que permiten que el virus se introduzca y el mecanismo para el cruce de la barrera interespecífica deben estudiarse con la base de la inoculación experimental de especies de mamíferos que puedan usarse como modelos para la infección humana. Sigue sin determinarse si el tracto gastrointestinal inferior puede actuar como vía de entrada. Es necesario estudiar las diferentes rutas de inoculación y llevar a cabo exámenes secuenciales de los diferentes tejidos para la replicación de virus a lo largo del curso de la infección.

Sólo así, las conjeturas sobre las vías de infección en humanos se convertirán en certezas.

### 4. MIEMBROS DEL COMITÉ CIENTÍFICO

Herbert Budka, Sava Buncic, Pierre Colin, John D Collins, Christian Ducrot, James Hope, Mac Johnston, Günter Klein, Hilde Kruse, Ernst Lücker, Simone Magnino, Riitta Liisa Maijala, Antonio Martínez López, Christophe Nguyen-The, Birgit Noerrung, Servé Notermans, George-John E Nychas, Maurice Pensaert, Terence Roberts, Ivar Vågsholm, Emmanuel Vanopdenbosch

### 5. AGRADECIMIENTOS

El Comité Científico de Riesgos Biológicos agradece la ayuda del grupo de trabajo que ha preparado el borrador del informe: Maurice Pensaert, Kristen Van Reeth and C.S. Kyriakis

### 6. REFERENCIAS

Andries K, Pensaert MB. Immunofluorescence studies on the pathogenesis of hemagglutinating encephalomyelitis virus infection in pigs after oronasal inoculation. Am J Vet Res. 1980; 41: 1372-8.

Apisarntharak A, Kitphati R, Thongphubeth K, Patoomanunt P, Anthanont P, Auwanit W, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Saeng-Aroon S, Waicharoen S, Apisarntharak P, Storch GA, Mundy LM, Fraser VJ. Atypical avian influenza (H5N1). Emerg Infect Dis. 2004; 10: 1321-4.

Baum LG, Paulson JC. Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. Acta Histochem Suppl. 1990; 40: 35-8.

Beard CW, Brugh M, Johnson DC. Laboratory studies with the Pennsylvania avian influenza viruses (H5N2). Proceedings of the 88th Annual Conference of the United States animal Health Association. 1984; Fort Worth, TZ, USA:462-473 1984.



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

- Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, Lochindarat S, Nguyen TK, Nguyen TH, Tran TH, Nicoll A, Touch S, Yuen KY; Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med*. 2005; 353: 1374-85.
- Cappucci DT Jr, Johnson DC, Brugh M, Smith TM, Jackson CF, Pearson JE, Senne DA. Isolation of avian influenza virus (subtype H5N2) from chicken eggs during a natural outbreak. *Avian Dis*. 1985; 29: 1195-200.
- Choi YK, Ozaki H, Webby RJ, Webster RG, Peiris JS, Poon L, Butt C, Leung YH, Guan Y. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China. *J Virol*. 2004 Aug;78(16):8609-14
- Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H, Webby RJ, Puthavathana P, Buranathal C, Chaisingh A, Auewarakul P, Hanh NT, Ma SK, Hui PY, Guan Y, Peiris JS, Webster RG. Studies of H5N1 Influenza Virus Infection of Pigs by Using Viruses Isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *Journal of Virology*, 2005; 10821–10825.
- Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*. 1994 Nov 15; 205: 17-23.
- de Jong MD, Bach VC, Phan TQ, Vo MH, Tran TT, Nguyen BH, Beld M, Le TP, Truong HK, Nguyen VV, Tran TH, Do QH, Farrar J. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med*. 2005; 352: 686-91.
- de Jong MD, Hien TT. Avian influenza A (H5N1). *Journal of Clinical Virology*, 2006; 35: 2-13
- Dybing JK, Schultz-Cherry S, Swayne DE, Suarez DL, Perdue ML. Distinct pathogenesis of Hong Kong-origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses. *J Virol*. 2000; 74: 1443-50.
- EFSA. Scientific report on animal health and welfare aspects of avian influenza. Annex to the EFSA Journal (2005) 266, 1 - 21 ([http://www.efsa.eu.int/science/ahaw/ahaw\\_opinions/1145/ahaw\\_op\\_ej266\\_avianinfluenza\\_annex\\_en3.pdf](http://www.efsa.eu.int/science/ahaw/ahaw_opinions/1145/ahaw_op_ej266_avianinfluenza_annex_en3.pdf))
- Ellis TM, Bousfield RB, Bissett LA, Dyrting KC, Luk GS, Tsim ST, Sturm-Ramirez K, Webster RG, Guan Y, Malik Peiris JS. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathology* 2004; 33: 492-505.
- Fiszon B, Hannoun C, Garcia-Sastre A, Villar E, Cabezas JA. Comparison of biological and physical properties of human and animal A(H1N1) influenza viruses. *Res Virol*. 1989; 140: 395-404.



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

- Gao P, Watanabe S, Ito T, Goto H, Wells K, McGregor M, Cooley AJ, Kawaoka Y. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. J Virol. 1999; 73: 3184-9.
- Gesser RM, Koo SC. Oral inoculation with herpes simplex virus type 1 infects enteric neuron and mucosal nerve fibers within the gastrointestinal tract in mice. J Virol. 1996 Jun;70(6):4097-102.
- Govorkova EA, Rehg JE, Krauss S, Yen HL, Guan Y, Peiris M, Nguyen TD, Hanh TH, Puthavathana P, Long HT, Buranathai C, Lim W, Webster RG, Hoffmann E. Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. J Virol. 2005; 79: 2191-8.
- Hayden F, Croisier A. Transmission of avian influenza viruses to and between humans. J Infect Dis. 2005; 192: 1311-4.
- Hinshaw VS, Webster RG, Easterday BC, Bean WJ Jr. Replication of avian influenza A viruses in mammals. Infect Immun. 1981; 34: 354-61.
- Horby P. Update on Epidemiological Aspects of H5N1. Proceedings of the 18th European Meeting and its Prevention. 2005; La Baule, France
- Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. J Virol. 1998; 72: 7367-73.
- Kawaoka Y, Bordwell E, Webster RG. Intestinal replication of influenza A viruses in two mammalian species. Brief report. Arch Virol. 1987; 93: 303-8.
- Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RA, Amonsin A, Payungporn S, Noppornpanth S, Wattanodorn S, Theambooniers A, Tantilertcharoen R, Pattanarangsarn R, Arya N, Ratanakorn P, Osterhaus DM, Poovorawan Y. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. Emerg Infect Dis. 2004; 10: 2189-91.
- Kishida N, Sakoda Y, Isoda N, Matsuda K, Eto M, Sunaga Y, Umemura T, Kida H. Pathogenicity of H5 influenza viruses for ducks. Arch Virol. 2005; 150: 1383-92.
- Koopmans M., Wilbrink B., Conyn M., Natrop G., Van der Nat H., Vennema H., Meijer A., Van Steenbergen J., Fouchier R., Osterhaus A. Bosman A. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. The Lancet 2004; 363: 5870-593.
- Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Van Amerongen G, Osterhaus AD. Pathology of human influenza A (H5N1) virus infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). Vet Pathol. 2003 May;40(3):304-10.



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

- Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, van Amerongen G, Baars M, Fouchier R, Osterhaus A. Avian H5N1 influenza in cats. *Science*. 2004; 306: 241.
- Laudert E, Halvorson D, Sivanandan V, Shaw D. Comparative evaluation of tissue tropism characteristics in turkeys and mallard ducks after intravenous inoculation of type A influenza viruses. *Avian Dis*. 1993; 37:773-80.
- Lee JS, Hanson RP. Effects of bile and gastrointestinal secretions on the infectivity of Newcastle disease virus. *Infect Immun*. 1975; 11: 692-7.
- Lipatov AS, Krauss S, Guan Y, Peiris M, Rehg JE, Perez DR, Webster RG. Neurovirulence in mice of H5N1 influenza virus genotypes isolated from Hong Kong poultry in 2001. *J Virol*. 2003; 77: 3816-23.
- Liu J, Xiao H, Lei F, Zhu Q, Qin K, Zhang XW, Zhang XL, Zhao D, Wang G, Feng Y, Ma J, Liu W, Wang J, Gao GF. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*. 2005; 309:1206.
- Loeffen W, de Boer E, Koch G. Infection with avian influenza virus (H7N7) in Dutch pigs. Proceedings ESVV congress St. Malo France 2003, p. 50.
- Loeffen W, de Boer E, Koch G. Transmission of a highly pathogenic avian influenza virus to swine in the Netherlands. Proceedings of the in-between congress of the International Society for Animal Hygiene. 2004; St. Malo, France: 329-30
- Lu H, Castro AE, Pennick K, Liu J, Yang Q, Dunn P, Weinstock D, Henzler D. Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Dis*. 2003; 47: 1015-21.
- Lu H, Dunn PA, Wallner-Pendleton EA, Henzler DJ, Kradel DC, Liu J, Shaw DP, Miller P. Investigation of H7N2 avian influenza outbreaks in two broiler breeder flocks in Pennsylvania, 2001-02. *Avian Dis*. 2004; 48: 26-33.
- Lu X, Tumpey TM, Morken T, Zaki SR, Cox NJ, Katz JM. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans. *J Virol*. 1999; 73: 5903-11.
- Maines TR, Lu XH, Erb SM, Edwards L, Guarner J, Greer PW, Nguyen DC, Szretter KJ, Chen LM, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Nguyen DT, Nguyen T, Nguyen HH, Kim JH, Hoang LT, Kang C, Phuong LS, Lim W, Zaki S, Donis RO, Cox NJ, Katz JM, Tumpey TM. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *J Virol*. 2005; 79: 11788-800.
- Mase M, Imada T, Nakamura K, Tanimura N, Imai K, Tsukamoto K, Yamaguchi S. Experimental assessment of the pathogenicity of H5N1 influenza A viruses isolated in Japan. *Avian Dis*. 2005a; 49: 582-4.



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

- Mase M, Eto M, Tanimura N, Imai K, Tsukamoto K, Horimoto T, Kawaoka Y, Yamaguchi S. Isolation of a genotypically unique H5N1 influenza virus from duck meat imported into Japan from China. *Virology*. 2005b; 339(1):101-9.
- Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol*. 1999; 73: 1146-55.
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 4620-4.
- Mettenleiter TC. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res*. 2003; 92: 197-206.
- Moses HE, Brandley CA, Jones EE. The isolation and identification of fowl plague virus. *American Journal of Veterinary Research* 1948; 9: 314-328.
- Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H. Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Causes Coagulopathy in Chickens. *Microbiol Immunol*. 2006; 50: 73-81.
- Narayan O, Lang G, Rouse BT. A new influenza A virus infection in turkeys. IV. Experimental susceptibility of domestic birds to virus strain turkey-Ontario 7732-1966. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1969; 26: 149-65.
- Nishimura H, Itamura S, Iwasaki T, Kurata T, Tashiro M. Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection.. *J Gen Virol*. 2000; 81: 2503-10.
- Perkins LE, Swayne DE. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol*. 2001; 38: 149-64.
- Perkins LE, Swayne DE. Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Dis*. 2002; 46: 53-63.
- Pick J, De Lemos C, Ciannella A. Fine structure of nerve terminals in the human gut. *The Anatomical Record*. 2005; 169: 131-45.
- Rimmelzwaan GF, Kuiken T, van Amerongen G, Bestebroer TM, Fouchier RA, Osterhaus AD. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. *J Virol*. 2001; 75: 6687-91.
- Rimmelzwaan GF, van Riel D, Baars M, Bestebroer TM, van Amerongen G, Fouchier RA, Osterhaus AD, 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: 176-83.



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

Scholtissek C. Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. Vaccine. 1985; 3: 215-8.

Sims LD, Domenech J, Benigno C, Kahn S, Kamata A, Lubroth J, Martin V, Roeder P. Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. Vet Rec. 2005; 157: 159-64.

Starick E, Werner O. Detection of H7 avian influenza virus directly from poultry specimens. Avian Dis. 2003; 47: 1187-9.

Steven A and Lowe JS. 2005 - Human Histology, Textbook, 3rd edition 2005; Elsevier Mosby: 170-71

Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD, Garten W. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. EMBO J. 1992 ; 11: 2407-14.

Suzuki Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. Biol Pharm Bull. 2005; 28: 399-408.

Swayne DE, Beck JR. Heat inactivation of avian influenza and Newcastle disease viruses in egg products. Avian Pathol. 2004; 33: 512-8.

Swayne DE, Beck JR. Experimental study to determine if low-pathogenicity and high-pathogenicity avian influenza viruses can be present in chicken breast and thigh meat following intranasal virus inoculation. Avian Dis. 2005; 49: 81-5.

Tanaka H, Park CH, Ninomiya A, Ozaki H, Takada A, Umemura T, Kida H. Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice. Vet Microbiol. 2003; 95: 1-13.

Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, Damrongwatanapokin S, Theamboonlers A, Payungporn S, Nanthapornphiphat K, Ratanamungklanon S, Tunak E, Songserm T, Vivatthanavanich V, Lekdumrongsak T, Kedsangsakonwut S, Tunhikorn S, Poovorawan Y. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. Emerg Infect Dis. 2005; 11: 699-701

The World Health Organization (WHO); <http://www.who.int>

Tian G, Zhang S, Li Y, Bu Z, Liu P, Zhou J, Li C, Shi J, Yu K, Chen H. Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics. Virology. 2005; 341: 153-62.

Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen VC, Pham TS, Vo CD, Le TQ, Ngo TT, Dao BK, Le PP, Nguyen TT, Hoang TL, Cao VT, Le TG, Nguyen DT, Le HN, Nguyen KT, Le HS, Le VT, Christiane D, Tran TT, Menno de J, Schultsz C, Cheng P, Lim W, Horby P, Farrar J; World Health Organization International Avian



## Informe científico sobre los alimentos como posible fuente de infección con virus de influenza aviar altamente patógena en humanos y otros mamíferos

Influenza Investigative Team. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1179-88.

Tumpey TM, Suarez DL, Perkins LE, Senne DA, Lee JG, Lee YJ, Mo IP, Sung HW, Swayne DE. Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. *J Virol*. 2002; 76: 6344-55.

Tumpey TM, Suarez DL, Perkins LE, Senne DA, Lee J, Lee YJ, Mo IP, Sung HW, Swayne DE. Evaluation of a high-pathogenicity H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. *Avian Dis*. 2003; 47: 951-5.

Uiprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, Pooruk P, Srisook K, Peiris M, Nicholls JM, Chokephaibulkit K, Vanprapar N, Auewarakul P. Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11: 1036-41.

Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*. 1978; 84: 268-78.

Webster RG, Guan Y, Peiris M, Walker D, Krauss S, Zhou NN, Govorkova EA, Ellis TM, Dyrting KC, Sit T, Perez DR, Shortridge KF. Characterization of H5N1 influenza viruses that continue to circulate in geese in southeastern China. *J Virol*. 2002; 76: 118-26.

White MR, Crouch E, van Eijk M, Hartshorn M, Pemberton L, Tornøe I, Holmskov U, Hartshorn KL. Cooperative anti-influenza activities of respiratory innate immune proteins and neuraminidase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 288: L831-40.

Zambon MC. The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol*. 2001; 11: 227-41.

Ziegler AF, Davison S, Acland H, Eckroade RJ. Characteristics of H7N2 (nonpathogenic) avian influenza virus infections in commercial layers, in Pennsylvania, 1997-98. *Avian Dis*. 1999;43: 142-9.

Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Shieh WJ, Zaki S, Katz JM. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. *J Virol*. 2002; 76: 4420-9.