

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



**BUSQUEDA DE FLAVIVIRUS EN MOSQUITOS DE
HUMEDALES ESPAÑOLES: ANÁLISIS
MOLECULARES DEL VIRUS WEST NILE Y
OTROS FLAVIVIRUS.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ana Vázquez González

Bajo la dirección de los doctores

Antonio Tenorio Matanzo
M^a Paz Sánchez-Seco Fariñas

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-9264-5

© Ana Vázquez González, 2008



***BÚSQUEDA DE FLAVIVIRUS EN MOSQUITOS
DE HUMEDALES ESPAÑOLES. ANÁLISIS
MOLECULAR DEL VIRUS WEST NILE Y
OTROS FLAVIVIRUS***

Ana Vázquez González

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



**BÚSQUEDA DE FLAVIVIRUS EN MOSQUITOS
DE HUMEDALES ESPAÑOLES. ANÁLISIS
MOLECULAR DEL VIRUS WEST NILE Y
OTROS FLAVIVIRUS**

TESIS DOCTORAL

Ana Vázquez González
Madrid, 2008

Memoria presentada por D^a. Ana Vázquez González para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Octubre de 2008

El trabajo presentado ha sido realizado en el laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas del Instituto de Salud Carlos III. Ha sido financiado a merced de una beca Intramural 05/0005 del ISCIII financiado por el Ministerio de Sanidad

Los Investigadores Titulares de OPIS, D. Antonio Tenorio Matanzo y D^a M^a Paz Sánchez-Seco Fariñas, pertenecientes al Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III,

CERTIFICAN:

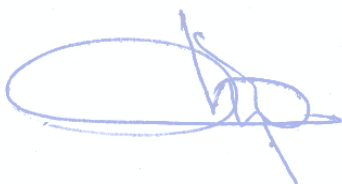
Que la tesis doctoral titulada “Búsqueda de flavivirus en mosquitos de humedales españoles. Análisis molecular del virus West Nile y otros flavivirus” que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas D^a. Ana Vázquez González, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada en las dependencias del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, bajo nuestra dirección y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como directores de la mencionada tesis doctoral.

En Madrid, a 1 de octubre de dos mil ocho.

Fdo.: Antonio Tenorio Matanzo

Fdo.: M^a Paz Sánchez-Seco Fariñas



Hay que vivir con la certeza de que envejeceremos y que no será algo bueno, bonito, ni alegre. Y decirse que lo importante es el ahora: construir, algo, ahora, a toda costa, con todas nuestras fuerzas. Escalar paso a paso, cada uno su propio Everest y hacerlo de manera que cada paso sea una pizca de eternidad.

Para eso sirve el futuro: para construir el presente con verdaderos proyectos de seres vivos.

Muriel Barbery

***A mis padres,
con todo mi corazón***

Agradecimientos

Muchas son las personas que de un modo u otro me han ayudado a lo largo de los años que ha durado esta tesis doctoral, tanto a nivel personal como profesional, y me gustaría transmitir mi profundo agradecimiento a todas y cada una de ellas. Espero no olvidarme de nadie.

Debo retomar a mis comienzos en el mundo de la ciencia. Mi primer contacto con batas y pipetas fue en el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, donde tuve la oportunidad de aprender mucho y conocer a gente estupenda. Gracias a Elena, M^a José y Bea, por todos los momentos compartidos.

Fue en la facultad de Veterinaria, gracias Chema, donde comenzó mi experiencia en el mundo de la investigación, donde a parte de adquirir grandes conocimientos, me permitió compartir unos años con gente maravillosa: Cinta, Mercedes, Isabel, Luis, Javier, Fran, Aurora, Vane, Vero, Gema, Esther C., Adri, Andrea, Inma y especialmente Esther A. Muchas gracias a todos por demostrarme lo que es un gran equipo de compañerismo y por las largas jornadas inagotables compartidas con todos vosotros. Gracias Vero por guiarme en la facultad en esta fase final. Siempre os recordaré.

Mi especial reconocimiento a mis directores de tesis. Al Dr. Antonio Tenorio por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y por adentrarme en el maravilloso mundo de las arbovirosis. Ha sido un honor conocer tan de cerca a un "auténtico genio de la ciencia". Muchas gracias a la Dra. M^a Paz Sánchez-Seco por haber proporcionado la base de esta tesis, por su apoyo y por haberme ayudado a "sobrevivir" durante los duros meses finales de escritura. Gracias a ambos por haber confiado en mí en todo momento y haberme enseñado todo lo que sé.

Quiero agradecer a todos los miembros del grupo de investigación la compañía, risas, apoyo y ayuda prestada. Nunca olvidaré esos momentos que hemos pasado en el cuartito del café, si no fuera por esos ratitos..... Gracias a los que aún estáis: Antonio, M^a Paz, Teresa, M^a Angeles, Lourdes, Paqui, M^a Jo, Giovanni y Anabel. A los que ya no: Ximena, Juan, María, Cristina y Noelia. Y a los recién llegados: Lola y Arancha. Son muchos los momentos compartidos y os aseguro que gracias a vosotros esta tesis ha sido posible, porque hay en ella algo de cada uno de vosotros. En especial quería agradecer a Noelia y Paqui el haberme regalado su amistad.

No puedo olvidarme de los "los bacteriólogos", por los buenos momentos que hemos compartido tanto en el laboratorio, como fuera de el. Gracias a Pedro, Horacio, Isa J., Isa R., Raquel, Bruno, Manuela, Cristina, Cati, Paloma, Mangesh, Álvaro y Montse. Es un lujo compartir "espacios y micro-clima" con vosotros. Gracias Nati por tu compañía y tus ánimos en aquellas tardes eternas en el laboratorio.

A Gustavo Palacios, por haberme brindado la oportunidad de ir a Nueva York, haberme iniciado en el inglés y por ser mi maestro en filogenia, nunca olvidaré mi estancia al otro lado del charco.

A todos los miembros de la red EVITAR, en especial a los mosquiteros, por haberme proporcionado la "materia prima" de esta tesis. Gracias a Ramón y Santi por haber preparado mi estancia en Huelva y Doñana, lugar al que he cogido un gran cariño durante estos años, por su gente, la experiencia vivida y los descubrimientos que allí se han realizado (ese Malo-malísimo...). Muchas gracias a Isidro, por esos muestreos en Doñana. A Santi, Paco, Jose Carlos, Antonio y Juani del Servicio de Control de Mosquitos de la Diputación Provincial de Huelva, por haberme acogido con tanto cariño y haberme enseñado tanto sobre el maravilloso mundo de los vectores. Siempre estareis en mi recuerdo.

A mi "familia de Huelva", Dolores, Gaspar, M^a lo, M^a Jesus y Juani (venga... también al Tosca y "la reunión", jajajaja). Mil gracias por haberme tratado con tanto cariño y dulzura durante todo el tiempo que pasé allí, hicisteis que me sintiera como en mi propia casa.

A los "becarios EVITARIOS", ha sido un auténtico placer compartir experiencias, inquietudes y alguna que otra fiesta con vosotros. Gracias a Diana, Juan, Sara, Ximena, Guillermo y David, sólo por haberos conocido ha valido la pena la experiencia. Muchas gracias de verdad David, por haberme apoyado tanto estos últimos meses, han sido muy duros y tus palabras (mejor dicho, letras) de aliento me han ayudado mucho.

A Concha Gómez Tejedor, por permitirme usar las instalaciones BSL-3 de Algete. Gracias a Gema, Tomás, Azucena y Rubén por su inestimable ayuda durante la realización de las pruebas experimentales con animales, aprendí mucho con vosotros.

A mis amigos, por compartir tanto los buenos como los malos momentos y sobre todo por haberme premiado con su amistad. A Víctor, Yoli, Cris, Sonia, Bea, Sulay, Pablo y Esther. Saber que estais ahí es mucho.

Muchísimas gracias a mi familia, porque sois lo más importate. A mis abuelos, Pilar y Mariano, porque siempre me habeis ayudado y apoyado aún sin entender a la "descarriada" de sus nietos. Y a mis "ángeles de la guarda", Carmen y Pablo, habeis sido un ejemplo de bondad y humildad, siempre estareis en mi corazón.

A mi cuñado, porque siempre has sido como un hermano mayor para mí. A mi hermana, porque todos los días me das una lección de superación y fortaleza, por los momentos compartidos, por ser mi hermana y amiga a la vez. A mis dos soles, Paula y Marina, por iluminar mis días grises con su energía y alegría y por recordarme que lo más importante en la vida es compartir el tiempo con las personas que quieres, sin más.

A mis padres, por vuestro cariño incondicional. Gracias Papa por las vacas, por haber trabajado siempre para sacar a tu familia adelante, por luchar todos los días y por enseñarme que hay que vivir la vida sin hacer daño a nadie. Gracias Mama, por tu dedicación, fortaleza, porque siempre has tirado del carro para adelante y por enseñarme a disfrutar con alegría de todo lo que nos ofrece la vida. Sois los mejores padres que podría haber tenido.

A Gus, no tengo palabras. Gracias por todo, tu apoyo, ayuda, comprensión... eres único y especial. Gracias por quererme tanto, por compartir tu vida conmigo y por ir añadiendo juntos fotos al álbum de la vida.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1 ARBOVIRUS	1
2 FAMILIA <i>FLAVIVIRIDAE</i>	2
2.1 Género <i>Flavivirus</i>	3
2.1.1 Morfología	4
2.1.2 Propiedades Físico-químicas	4
2.1.3 Genoma: organización y estructura	4
2.1.4 Ciclo de replicación viral	8
2.1.5 Taxonomía. Propiedades antigénicas y filogenéticas	9
3 VIRUS WEST NILE	16
3.1 Introducción	16
3.2 Distribución y brotes epidémicos	18
3.3 Filogenia	24
3.4 Ciclo ecológico	27
3.4.1 Vectores	29
3.4.2 Hospedadores	30
3.4.3 Rutas de transmisión en humanos	31
3.5 Patología y clínica	31
3.6 Diagnóstico de laboratorio	32
3.6.1 Diagnóstico directo	32
3.6.2 Diagnóstico indirecto	33
3.7 Tratamiento	34
3.8 Vacunas	34
3.9 Vigilancia y control de la enfermedad	35
OBJETIVOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1 ESTUDIO EN CULÍCIDOS Y FLEBOTOMOS	37
1.1 Capturas: áreas geográficas y trampas de captura	37
1.2 Clasificación y elaboración de los lotes	38
2 EXTRACCIÓN DEL ARN VIRAL	39
3 AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	40
3.1 Técnica de RT-Nested-PCR genérica para detección de flavivirus	40
3.2 Reacción de Nested-PCR específica para West Nile	41
4 ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	42
4.1 Visualización de los productos de amplificación	42
4.2 Purificación de ácidos nucleicos	42
4.3 Secuenciación de ácidos nucleicos	43
5 ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS	44

5.1	Obtención de la secuencia consenso.....	44
5.2	Alineamientos de las secuencias consenso.....	44
5.3	Análisis filogenético.....	44
6	ANÁLISIS GENÓMICO DE LOS VIRUS DETECTADOS.....	45
6.1	Desarrollo de una RT-Nested-PCR genérica en el gen NS5 para estudios de filogenia.....	45
6.2	Validación de la técnica.....	47
6.3	Análisis filogenético.....	48
7	PRUEBA DE LA RIBONUCLEASA.....	48
8	ANÁLISIS GENÓMICO DE UNA CEPA DEL VIRUS KUNJIN (KJ502/66).....	50
8.1	Secuenciación del genoma completo.....	50
8.2	Análisis filogenético.....	51
9	CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.....	52
9.1	Clonación de los productos amplificados.....	52
9.2	Transformación en bacterias.....	52
9.3	Purificación del ADN plasmídico.....	53
10	DESARROLLO DE UNA PCR EN TIEMPO REAL PARA EL VIRUS WEST NILE.....	53
10.1	Obtención de quimeras virales.....	54
10.2	Obtención y optimización del control interno.....	55
10.3	Optimización y validación de la PCR en tiempo real.....	55
11	AISLAMIENTO VÍRICO.....	56
11.1	Aislamiento en cultivos celulares.....	56
11.1.1	Línea celular Vero e6.....	56
11.1.2	Línea celular C6/36/HT.....	57
11.1.3	Línea celular RK13.....	58
11.2	Aislamiento en modelos animales.....	58
11.2.1	Embriones de pollo.....	58
11.2.2	Ratones lactantes.....	59
12	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	59
12.1	Tinción negativa.....	59
12.2	Inclusion (o ultramicrotoma).....	60
	RESULTADOS.....	61
1	BÚSQUEDA DE FLAVIVIRUS EN CULÍCIDOS Y FLEBOTOMOS.....	61
1.1	Detección de flavivirus.....	61
1.2	Detección de West Nile.....	65
2	FILOGENIA DE FLAVIVIRUS.....	65
3	COMPROBACIÓN DE LA EXISTENCIA DE ARN DE FLAVIVIRUS.....	72
4	ANÁLISIS MOLECULAR DEL VIRUS KJ502/66.....	73
5	ANÁLISIS MOLECULAR DEL VIRUS WEST NILE (HU2925/06) ESPAÑOL.....	79
5.1	Amplificación del genoma.....	79
5.2	Análisis filogenético.....	79
6	AISLAMIENTO VÍRICO.....	82
6.1	Cultivos celulares.....	82
6.1.1	Virus de mosquitos.....	82
6.1.2	Virus KJ502/66.....	82
6.1.3	Virus West Nile (HU2925/06) español.....	83
6.2	Inoculación en modelos animales.....	85
6.2.1	Embriones de pollo.....	85
6.2.2	Ratones lactantes.....	85
7	DESARROLLO DE UNA PCR EN TIEMPO REAL PARA WEST NILE.....	86

7.1	Obtención de diferentes linajes de WNV y del control interno.....	86
7.2	Optimización del control interno.....	86
7.3	Optimización de la PCR en tiempo real.....	87
DISCUSIÓN	89
1	FLAVIVIRUS DETECTADOS EN CULÍCIDOS Y FLEBOTOMOS.....	89
1.1	Flavivirus propios de insecto.....	90
1.2	Flavivirus agrupados en la rama de los MBV.....	97
2	ANÁLISIS MOLECULAR DEL VIRUS WEST NILE DETECTADO EN ESPAÑA.....	99
3	REVISIÓN DE GENOTIPOS DE WNV.....	101
4	DESARROLLO DE UN NUEVO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE TODOS LOS GENOTIPOS DE WNV.....	103
5	SÍNTESIS.....	104
CONCLUSIONES	107
LISTADO DE FIGURAS	109
LISTADO DE TABLAS	111
ABREVIATURAS	113
BIBLIOGRAFÍA	117

Introducción

1 ARBOVIRUS

Los virus del género *Flavivirus* pertenecen a la familia *Flaviviridae*, y se incluyen, junto con otros virus pertenecientes a otras familias y géneros, entre los denominados **arbovirus** (del inglés ARthropod BOrne VIRUS).

El ciclo natural de los arbovirus suele implicar a un artrópodo hematófago y a un hospedador vertebrado. En muchos de los modelos de transmisión, el arbovirus se transmite al vector cuando éste se alimenta de la sangre de un hospedador infectado; en el vector y tras una viremia primaria, el virus infecta las glándulas salivares (periodo de incubación extrínseco), de modo que cuando vuelve a alimentarse de la sangre de un vertebrado susceptible, le transmite la infección. En el hospedador vertebrado amplificador, el virus se multiplica, produciendo títulos elevados durante la viremia secundaria (periodo de incubación intrínseco), pudiendo en ese momento el hospedador infectar a otro vector, cerrando el ciclo. Durante los meses de invierno en climas fríos, el número de vectores disminuye o incluso llega a desaparecer; así las infecciones por arbovirus tienden a presentar un patrón estacional, siendo más abundantes durante el verano y otoño en regiones templadas y en las lluviosas en los trópicos, coincidiendo con la mayor abundancia y actividad de los vectores en estas estaciones. Por otro lado, se han descrito algunos mecanismos desarrollados por algunos virus para sobrevivir durante los meses de invierno, como son la transmisión transovárica o entre diferentes estadios del vector (larva-ninfa-adulto)(Miller y cols., 2000), así como la persistencia viral en el vector (Kuno y Chang, 2005). Además se han descrito re-introducciones de arbovirus aparentemente controlados a través de hospedadores infectados (Rappole y cols., 2000).

Se han registrado 534 virus en el Catálogo Internacional de Arbovirus (Karabatsos, 1985), de los cuales 214 están clasificados, 287 se consideran posibles arbovirus y 33 de ellos son provisionales. De los virus recogidos en el catálogo, 134 causan enfermedades en el hombre. Son taxonómicamente diversos, perteneciendo a ocho familias virales y 14 géneros, siendo los más importantes para la salud pública los pertenecientes a tres familias: *Flaviviridae*, *Togaviridae* y *Bunyaviridae* (Gubler, 2002). La mayoría de las infecciones en humanos son asintomáticas y el cuadro clínico, cuando se presenta, puede ser muy variado.

Durante los últimos 30 años ha habido una re-emergencia y emergencia global de las enfermedades arbovirales que está provocando serios problemas en la salud pública. Los factores responsables de este hecho se han asociado con cambios demográficos y sociales recientes que han influido en la dinámica de transmisión de estas enfermedades, como son la urbanización, deforestación, creación de nuevos embalses y sistemas de riego, aparición de chabolas, desarrollo de sistemas para el manejo de desechos y sistemas de recogida y almacenamiento del agua entre otros (Gubler, 2002). Todos ellos han contribuido al incremento de poblaciones de mosquitos vectores en estrecho contacto con el hombre. Quizás el mayor impacto sea el que se ha asociado al aumento en la velocidad y en la frecuencia del transporte de personas, animales y mercancías, que está facilitando la rápida dispersión de patógenos, vectores y reservorios.

Los virus transmitidos por mosquito del género *Flavivirus* proporcionan algunos de los más importantes ejemplos de enfermedades emergentes, como el enorme resurgimiento del virus dengue (DENV) en áreas tropicales y subtropicales, la emergencia del virus West Nile (WNV) en el continente americano, la propagación del virus de la Encefalitis Japonesa (JEV) por Asia y Oceanía y recientemente la aparición del virus Usutu (USUV) en Austria en 2001, extendiéndose a Hungría en 2005 y detectándose en mosquitos en España en 2006, siendo éstas las únicas descripciones del virus fuera del continente africano asociándose a enfermedad y muerte en aves (Weissenböck y cols., 2002, Bakonyi y cols., 2007, Busquets y cols., 2008). Estos fenómenos que ahora se observan de una forma tan frecuente, podrían estar asociados a la intervención humana, tal como sucedió en la primera expansión documentada de una enfermedad arboviral a un área geográfica nueva, con el virus de la fiebre amarilla (YFV) que se transportó desde África Occidental a América en los siglos XVII-XVIII, probablemente en embarcaciones usadas para el transporte de esclavos (Mackenzie y cols., 2004). Algunos de los flavivirus más importantes desde un punto de vista clínico son: los 4 serotipos de DENV en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, YFV en África y en el centro y sur de América, JEV en Asia y Australia, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) en regiones templadas de Europa y Asia y WNV en África, Centro de Europa, Asia y recientemente en América.

2 FAMILIA FLAVIVIRIDAE

La familia *Flaviviridae* incluye tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. Aunque los pestivirus y hepacivirus tienen la misma estructura genómica y estrategias de replicación similares a los flavivirus, ninguno de los dos se transmite por artrópodos y podrían representar linajes que divergieron tempranamente en la evolución de la familia. Los pestivirus tienen importancia veterinaria y de entre los hepacivirus hay que destacar al virus de la hepatitis C por su importancia clínica en humanos (Tabla 1)(Calisher y Gould, 2003).

El genoma de los tres géneros es muy parecido tanto en tamaño (11 kb los flavivirus, 12,5 kb los pestivirus y 9,4 kb los hepacivirus) como en organización. Son virus envueltos, con un genoma de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva que codifica una única poliproteína, la cual está flanqueada por dos regiones no codificantes (NC) en

sus extremos 5' y 3' que forman estructuras secundarias específicas requeridas para la replicación y traducción del genoma. Cada género tiene sus propias características físicas, físico-químicas y biológicas que los diferencian. No se han demostrado relaciones antigénicas entre los virus de diferentes géneros.

Género / Virus	Hospedador	Modo de transmisión	Enfermedad	Distribución
Flavivirus				
Dengue 1-4	Humano	Mosquito	Fiebre, hemorragia	Mundial
Fiebre Amarilla	Primate/Humano	Mosquito	Hemorragia, hepatitis	África, América
Encefalitis Japonesa	Mamíferos, cerdo	Mosquito	Encefalitis	Asia, Australia
Encefalitis de Saint Louis	Mamíferos, aves	Mosquito	Encefalitis	América
Encefalitis de Murray Valley	Mamíferos, aves	Mosquito	Encefalitis	Australia
West Nile	Aves, humanos, mamíferos grandes y pequeños, ganado	Mosquito garrapatas	Fiebre, encefalitis, meningitis, hemorragia, hepatitis.	África, Europa, Asia, América, Australia, Oriente Medio.
Encefalitis transmitida por garrapata	Mamíferos	Garrapata	Encefalitis	Europa, Asia
Pestivirus				
Peste porcina clásica	Cerdo	Contacto	Fiebre, gastroenteritis	Europa, América
Diarrea Bovina	Ganado vacuno	Contacto	Enfermedad mucosas	Mundial
Hepacivirus				
Hepatitis C	Humanos	Parenteral, transfusión	Hepatitis, cáncer de hígado	Mundial

Tabla 1. Resumen de los virus pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, junto con sus hospedadores habituales, modo de transmisión, enfermedad que producen y distribución. Adaptado de Calisher, 2003.

2.1 Género *Flavivirus*

Este género está compuesto de 53 especies de virus y algunos de ellos como DENV, YFV, WNV, encefalitis de Saint Louis (SLEV), JEV o TBEV causan enfermedad en el ser humano (ICTV, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/lctv/index.htm>) (Calisher y Gould, 2003), que puede variar desde un síndrome febril hasta producir una encefalitis o fiebre hemorrágica, entre las manifestaciones más importantes. La mayoría de los miembros del género *Flavivirus* son arbovirus transmitidos a hospedadores vertebrados por un artrópodo vector, bien mosquitos (27 de ellos) o bien garrapatas (12 de ellos), en los cuales el virus replica activamente. El resto de flavivirus no tienen un vector artrópodo conocido. Además se han descrito los virus Kamiti River (KRV) y Cell Fusing Agent (CFAV) con capacidad de infectar sólo mosquitos y que se engloban en el género al compartir muchas de sus características moleculares. La especie tipo del género es YFV,

de cuyo nombre derivan tanto el del género como el de la familia (del latín flavus que significa “amarillo”)(Monath y Heinz, 1996).

2.1.1 Morfología

El tamaño del virión es de aproximadamente 50 nm de diámetro. Son partículas esféricas, con una envuelta lipídica procedente de la membrana plasmática de la célula a la que infectan y que ha sido modificada por la inserción de 2 glicoproteínas integrales de membrana, la proteína E y la proteína prM. En la maduración del virus la proteína prM se convierte en la proteína M por la acción de una proteasa celular y es incorporada al virión maduro. Dentro de la envuelta se localiza una nucleocápside icosaédrica de 30-35 nm, compuesta de múltiples copias de la proteína de la cápside de aproximadamente 12 kDa, en la que se encierra una única hebra de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb (Rice y cols., 1985, Petersen y Roehrig, 2001)(Figura 1).

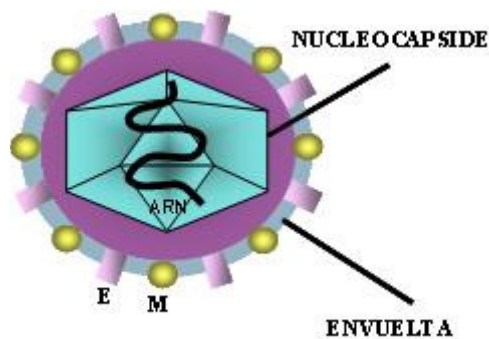


Figura 1. Esquema de la morfología de los flavivirus.

2.1.2 Propiedades Físico-químicas

Los viriones maduros tienen un coeficiente de sedimentación que varía entre 170 y 210 S y tiene una densidad de aproximadamente 1,19 g/cm³ a 1,23 g/cm³, dependiendo de la composición lipídica, que puede variar según cual sea el hospedador. Los virus son estables a pH ligeramente alcalino de 8,0, pero son fácilmente inactivados a pH ácido, a temperaturas por encima de los 40 °C, en presencia de disolventes orgánicos o detergentes, y por irradiación γ o con luz ultravioleta (Monath y Heinz, 1996). Además son sensibles a enzimas proteolíticas, que generan la pérdida de ciertas propiedades antigénicas. Se pueden conservar por años a -70 °C y se mantienen estables, una vez liofilizados, a 4 °C (Rice, 1996).

2.1.3 Genoma: organización y estructura

El genoma es un ARN de cadena sencilla, de aproximadamente 11.000 nucleótidos (nt), con polaridad positiva y representa un único ARNm en las células infectadas. Consiste en un único marco de lectura abierta (ORF) que codifica una única

poliproteína, que es procesada durante y después de la traducción por proteasas celulares y virales, generando tres proteínas estructurales (C, M y E) las cuales son codificadas en el extremo 5' y siete no-estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que son codificadas en el extremo 3' (Chambers y cols., 1990, Brinton, 2002)(Figura 2).

El genoma está flanqueado por las zonas 5' y 3' no codificantes (NC) de aproximadamente 100 nt y de 400 a 700 nt respectivamente, que se caracterizan por presentar una caperuza de tipo I (o cap tipo I) no vista en los otros géneros de la familia (m-7GpppAmp) en su extremo 5' y carecer de la cola de poli A en su extremo 3'. Estas regiones contienen estructuras secundarias muy conservadas, que dirigen los procesos de replicación, traducción y empaquetamiento del genoma (Rice, 1996). La función más significativa de la zona 5'NC probablemente reside en su complementariedad reversa con la 3'NC de las cadenas negativas virales, para formar el sitio de inicio de la síntesis de la cadena positiva, actuando la 3'NC como promotor de la síntesis de la cadena negativa.

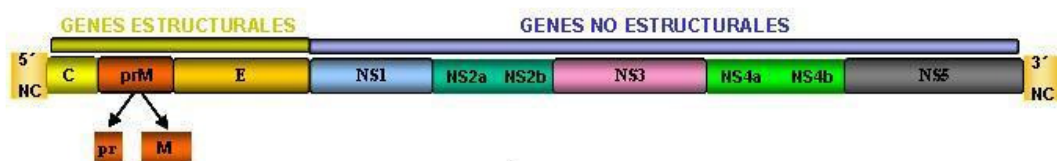


Figura 2. Esquema de la estructura genómica de los flavivirus.

Proteínas Estructurales

Son las proteínas de la cápside, la pre-membrana/membrana y de la envuelta, que interactúan con el ARN genómico viral y la membrana lipídica derivada del hospedador, para formar la partícula viral.

Proteína de la cápside (C)

Múltiples copias de esta proteína forman la nucleocápside. Consta de aproximadamente 120 aminoácidos y tiene un peso molecular que varía de 9 a 12 kDa entre los diferentes flavivirus. Tiene un marcado carácter básico, debido a la alta proporción de aminoácidos básicos presentes en su composición, que probablemente neutralizan la carga negativa de la molécula de ARN viral a la que está unida. En su extremo carboxilo tiene un dominio hidrofóbico que sirve como péptido señal para la traslocación de la prM en el retículo endoplasmático (RE), que se escinde de la proteína C madura por acción de una serin peptidasa viral. Además de su papel estructural, la proteína C también se ha encontrado en el núcleo de células infectadas y podría estar implicada en la regulación de la replicación viral por la vía de interacción con proteínas celulares del hospedador. En WNV también se la ha visto implicada en la inducción de muerte celular (apoptosis) en células infectadas tanto *in vivo* como *in vitro* (Beasley, 2005).

Proteína asociada a la membrana (M)

Puede encontrarse en dos formas, dependiendo del estado de maduración del virión:

- En viriones inmaduros o asociados a la célula: prM (aproximadamente 165 aminoácidos, de 18-20 kDa). Es una proteína glicosilada y forma un heterodímero con la proteína E, siendo esencial para el correcto plegamiento, asociación a membrana y ensamblaje de la proteína E de los flavivirus, lo que sugiere una función como chaperona. La interacción E-prM sirve para proteger a la proteína E de la inactivación irreversible producida por los cambios conformacionales prematuros en el medio ácido de las vesículas de transporte post-Golgi a la membrana celular (Rice y cols., 1985). Su extremo N-terminal contiene de uno a tres sitios de N-glicosilación y seis residuos de cisteína conservados (Nowak y cols., 1989).
- En viriones maduros o extracelulares: M (aproximadamente 75 aminoácidos y de 8 kDa). No es glicosilada ni presenta puentes disulfuros en su estructura. Resulta del procesamiento de prM y la eliminación de la porción amino-terminal. El corte, necesario para producir viriones infectivos, ocurre al final de su paso por el aparato de Golgi por furin proteasas del mismo y antes de la liberación del virus de la célula infectada (Stadler y cols., 1997). Tras el procesamiento de la preM, la proteína E se encuentra mayoritariamente en forma de homodímeros en la superficie del virión. En menores cantidades, se pueden encontrar también en los viriones extracelulares heterodímeros E-prM sin procesar (Beasley, 2005).

Proteína de la envoltura (E)

Tiene un peso molecular de 53 a 54 kDa y consta de aproximadamente 500 aminoácidos. Es la más conservada de todas las proteínas estructurales, se encuentra glicosilada en la mayoría de los virus de esta familia y contiene 12 residuos de cisteína conservados. (Guzmán y Kouri, 1996). Esta proteína desempeña un papel esencial en la unión a los receptores, la fusión con las membranas celulares y el ensamblaje de los viriones. Es fundamental en la inducción de la respuesta inmune protectora, al ser el antígeno responsable de la generación de anticuerpos neutralizantes; además afecta directamente al rango de hospedadores, tropismo hacia los diferentes tejidos y virulencia (Roehrig y cols., 2003). Contiene tres dominios estructurales y funcionales: un dominio central en hoja plegada (dominio I) unido por un extremo a una región que contiene el péptido de fusión que media la inserción a la membrana de la célula diana (dominio II) y por el otro a una tercera región tipo inmunoglobulina (dominio III) donde se encuentran los sitios de unión al receptor y que constituye la principal diana de los anticuerpos neutralizantes frente al virus (Rey y cols., 1995, Heinz y Allison, 2000). Es el componente principal de las proyecciones de la superficie del virión observadas por microscopía electrónica (M.E.) (Henchal y Putnak, 1990).

Proteínas no estructurales

La mayoría de las proteínas no estructurales son multifuncionales y todas ellas están implicadas directa o indirectamente en la síntesis de ARN viral, pero es poco lo que se conoce sobre las interacciones entre ellas y las proteínas de la célula huésped que podrían requerirse para la formación de complejos activos de replicación de ARN viral. Así pues, estas proteínas regulan la transcripción y replicación y también podrían interactuar

directamente con proteínas de la célula hospedadora para modular la respuesta frente a la infección (Beasley, 2005).

La **NS1** es una glicoproteína de 42 a 50 kDa que contiene dos o tres sitios de N-glicosilación y 12 residuos de cisteína conservados en su estructura. Puede encontrarse en la superficie celular o en el medio extracelular (Winkler y cols., 1989) por lo que constituye un blanco de la respuesta inmune humoral, capaz de inducir la generación de anticuerpos (no son neutralizantes pero sí proporcionan inmunidad protectora), entre los que se encuentran aquellos activadores del complemento (Chang, 1997). La célula infectada la expresa en su superficie siendo diana de la citólisis inmunológica, resultando muy interesante su uso potencial en la protección frente a la infección por flavivirus (Parrish y cols., 1991). Su función en la replicación viral no se conoce bien, aunque parece tener un papel importante en los procesos tempranos de replicación y también en la maduración del virión, tal vez cooperando en la conservación de una conformación apropiada de la proteína E inmadura (Fan y Mason, 1990). A su vez se ha visto que mutaciones en esta proteína afectan a la virulencia de la partícula viral (Pletnev, 2003).

La proteína **NS3** es la segunda en tamaño, con un peso molecular entre 67 y 70 kDa, está asociada a la membrana y se encuentra altamente conservada entre los flavivirus. Esta proteína juega un importante papel en la proteólisis y procesamiento de la poliproteína viral y en la síntesis del ARN (Chappell y cols., 2005). Recluta a las proteínas NS2B y NS5 para formar complejos con actividad proteasa y replicasa respectivamente. Además se ha visto que produce apoptosis (Prikhod'ko y cols., 2002). Se le atribuyen por lo tanto, tres actividades enzimáticas: proteasa, NTPasa y helicasa (Khromykh y cols., 2000). Además, el extremo carboxilo-terminal pudiera también estar involucrado en la formación de la caperuza y la metilación del ARN viral (Luo y cols., 2008).

La **NS5** es la proteína más grande (de 104-106 kDa) y la más conservada de los flavivirus. Está localizada en el extremo carboxilo terminal de la poliproteína viral. Su porción carboxilo terminal tiene la función de ARN polimerasa dependiente de ARN, incluyendo el motivo altamente conservado GDD, mientras que la porción amino terminal se corresponde con una metiltransferasa que se cree funciona en la metilación de la caperuza tipo I (Egloff y cols., 2002). Diferentes estudios han confirmado que la replicación viral requiere actividad polimerasa y metiltransferasa. La asociación de proteínas celulares con la NS5, parece ser también necesaria para la actividad de la polimerasa (Brinton, 2002). Aunque la replicación viral se produce en el citoplasma celular, la NS5 se ha detectado tanto en el núcleo como en el citoplasma de células infectadas.

Las proteínas **NS2A** (18-22 kDa), **NS2B** (13-15 kDa), **NS4A** (16,0-16,4 kDa) y **NS4B** (27-28 kDa) tienen un bajo grado de conservación y además carácter hidrofóbico (sugiriendo una asociación a membranas). La NS2A parece intervenir en el procesamiento del extremo carboxilo terminal de la NS1 y en coordinar el cambio entre los procesos encadenados de empaquetamiento y replicación del ARN (Khromykh y cols., 2001). La proteína NS2B está asociada a la membrana y está involucrada en la función proteasa de la NS3, al actuar como co-factor de la misma y siendo el complejo de NS2B/NS3 crucial para el procesamiento de la poliproteína viral (Bessaud y cols., 2006). Las funciones biológicas de NS4A y NS4B no están bien definidas, aunque parecen estar involucradas en la localización en membrana del complejo de replicación NS3/NS5 (Wengler y cols., 1990). Se requiere la unión de la NS4A a la NS1 para que se active la función replicasa de

la NS1 (Lindenbach y Rice, 1999). La NS4B es un determinante de virulencia y está implicada en procesos de replicación viral y evasión a la respuesta inmune del hospedador (Botha y cols., 2008).

2.1.4 Ciclo de replicación viral

La infección comienza con la entrada del virus a la célula a través de una endocitosis mediada por receptores celulares específicos para la proteína E. La identificación de 2 receptores de DENV4 sugirieron que otras moléculas de la superficie celular del hospedador son también necesarias para la entrada de los flavivirus (Salas-Benito y del Angel, 1997), como son las lectinas, integrinas, lamininas y glucosaminoglicanos (Kuno y Chang, 2005). De hecho, se ha visto que tanto la endocitosis mediada por clatrina, como por la unión a la integrina $\alpha\beta 3$, están implicadas en la unión y entrada a la célula (Chu y Ng, 2004, Davis y cols., 2006a). También se ha observado que la eficacia de la fusión entre el virus y las membranas de las células hospedadoras está influenciada por la composición lipídica de estas últimas, de tal manera que el colesterol y el ácido oleico favorecen la fusión mientras que la liofosfatidilcolina, la inhibe (Stiasny y Heinz, 2004). Recientemente se han identificado dos posibles receptores en las células del intestino de mosquitos del género *Aedes* (Mercado-Curiel y cols., 2006), pero siguen sin conocerse otros posibles receptores en células de mamíferos o en neuronas.

Tras la entrada del virus a la célula, se transporta en vesículas lisosomales, donde hay un entorno ácido, que favorece una fusión dependiente de pH de la membrana viral con la membrana vesicular, liberándose así la nucleocápside viral al citoplasma (Heinz y Allison, 2000). Una vez allí el ARN monocatenario de polaridad positiva, es leído como un único mensajero y traducido en una única poliproteína, la cual es procesada por proteasas virales y celulares (Rice y cols., 1985). Después la ARN polimerasa viral dependiente de ARN, junto con otras proteínas no estructurales virales y posiblemente proteínas celulares, copia las hebras complementarias negativas del molde de ARN genómico, las cuales constituyen a su vez el molde para la síntesis de nuevas moléculas (hebras positivas) (Monath y Heinz, 1996). Es una replicación asimétrica y semiconservativa y se ha visto en WNV, DENV y JEV (Cleaves, 1981, Chu y Westaway, 1985, Uchil y Satchidanandam, 2003) que se produce mayoritariamente en el citoplasma de la célula infectada, aunque también se ha localizado en el núcleo (Uchil, 2006) (Figura 3).

El ensamblaje del virión se inicia en el lumen del RE, cuando el genoma de ARN positivo se asocia con la proteína C para formar la nucleocápside y adquiere la envoltura de las membranas del RE del hospedador. Son partículas inmaduras que contienen heterodímeros E y prM (el precursor de M) acumulados en vesículas, y son partículas menos infecciosas que los viriones maduros (Guirakhoo y cols., 2003). La glicosilación de prM y su corte de la porción hidrofílica N-terminal de prM se da en la red trans-Golgi mediante furinas celulares o una proteasa relacionada, lo que supone la maduración del virión (Stadler y cols., 1997). Los viriones son transportados a la membrana plasmática en vesículas y liberados de la célula hospedadora por exocitosis a las 10-12 horas de

comenzar la infección y los máximos títulos de virus extracelular normalmente no se observan hasta 24 horas después.

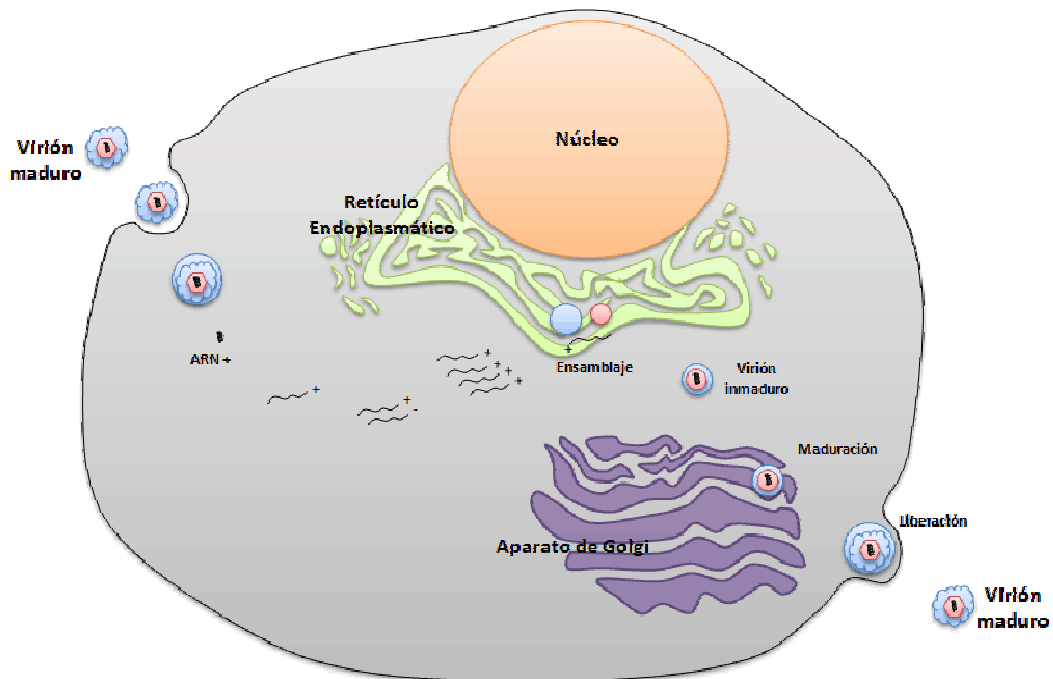


Figura 3. Esquema del ciclo replicativo de los flavivirus.

2.1.5 Taxonomía. Propiedades antigénicas y filogenéticas

Antigénicamente la proteína E de la envuelta, tal como ya se ha expuesto, es la mayor diana para los anticuerpos neutralizantes e induce inmunidad protectora frente a los flavivirus. Estos virus están relacionados y se dan reacciones cruzadas entre ellos al realizarse ensayos serológicos con anticuerpos policlonales en los ensayos de Fijación del Complemento (FC), Inhibición de la Hemaglutinación (IH) y ELISA (Inmunoensayo enzimático en fase sólida), siendo los ensayos de neutralización más discriminatorios, por lo que han sido usados para definir los diferentes serocomplejos entre los flavivirus más estrechamente relacionados.

Estos virus pueden ser agrupados en varios complejos antigénicos, siendo los más importantes: el grupo serológico de dengue, el de la encefalitis japonesa y un grupo menos cohesivo serológicamente que es el de fiebre amarilla (Mukhopadhyay y cols., 2005). Históricamente fueron clasificados en ocho complejos antigénicos basándose en experimentos de neutralización cruzada (Calisher y cols., 1989). En la actualidad se sigue la taxonomía y nomenclatura recomendada por el Comité Internacional en la Taxonomía de Virus (traducción del inglés: *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>) (Calisher y Gould, 2003), cuya clasificación está basada en el concepto de especie viral que considera: la morfología, organización genómica, relaciones en las secuencias de nucleótidos, características

antigénicas y ecológicas y asociaciones al vector, hospedador y enfermedad que producen (Tabla 2).

VECTOR	SERCOMPLEJO	ESPECIE	ABREV.	
GARRAPATA (TBV)	Mamífero MTBV	<i>Gadgets Gully</i>	GGYV	
		<i>Kyasanur Forest disease</i>	KFDV	
		<i>Langat</i>	LGTV	
		<i>Louping ill</i>	LIV	
		<i>Omsk hemorrhagia fever</i>	OHFV	
		<i>Powasan</i>	POWV	
		<i>Royal Farm</i>	RFV	
		<i>Karshi</i>	KSIV	
		<i>Tickborne encephalitis</i>	TBEV	
		Ave Marina STBV	<i>Kadam</i>	KADV
	<i>Meaban</i>		MEAV	
	<i>Saumarez Reef</i>		SREV	
	<i>Tyuleny</i>		TYUV	
	MOSQUITO (MBV)	Aroa	<i>Aroa</i>	AROAV
<i>Bussuquara</i>			BSQV	
<i>Iguape</i>			IGUV	
Dengue		<i>Naranjal</i>	NJLV	
		<i>Dengue 1, 2, 3 y 4</i>	DENV	
		<i>Kedougou</i>	KEDV	
		Encefalitis Japonesa	<i>Cacipacore</i>	CPCV
			<i>Japanese encephalitis</i>	JEV
			<i>Koutando</i>	KOUV
			<i>Murray Valley encephalitis</i>	MVEV
			<i>Alfuy</i>	ALFV
			<i>Saint Louis encephalitis</i>	SLEV
			<i>Usutu</i>	USUV
Kokobera		<i>West Nile</i>	WNV	
		<i>Kunjin</i>	KUNV	
		<i>Yaounde</i>	YAOV	
Ntaya		<i>Kokobera</i>	KOKV	
		<i>Stratford</i>	STRV	
		<i>Bagaza</i>	BAGV	
		<i>Ilheus</i>	ILHV	
	<i>Rocio</i>	ROCV		
Spondweni	<i>Israel turkey meningoencephalitis</i>	ITV		
	<i>Ntaya</i>	NTAV		
	<i>Tembusu</i>	TMUV		
	Fiebre amarilla	<i>Zika</i>	ZIKV	
		<i>Spowdweni</i>	SPOV	
		<i>Banzi</i>	BANV	
		<i>Bouboui</i>	BOUV	
	<i>Edge Hill</i>	EHV		

		<i>Jugra</i>	JUGV
		<i>Saboya</i>	SABV
		<i>Potiskum</i>	POTV
		<i>Sepik</i>	SEPV
		<i>Uganda</i>	UGSV
		<i>Wesselsbron</i>	WESSV
		<i>Yellow Fever</i>	YFV
DESCONOCIDO (UNKV)	Entebbe bat	<i>Entebbe bat</i>	ENTV
		<i>Sokoluk</i>	SOKV
		<i>Yokose</i>	YOKV
	Modoc	<i>Apoi</i>	APOIV
		<i>Cowbone</i>	CRV
		<i>Jutiapa</i>	JUTV
		<i>Modoc</i>	MODV
		<i>Sal Vieja</i>	SVV
		<i>San Perlita</i>	VPV
	Rio Bravo	<i>Bukalasa</i>	BBV
		<i>Carey Island</i>	CIV
		<i>Dakar bat</i>	DBV
		<i>Montana myotis leukoencephalitis</i>	MMLV
		<i>Phnom Penh bat</i>	PPBV
		<i>Batu Cave</i>	BCV
		<i>Rio Bravo</i>	RBV
	Especie propuesta	<i>Cell Fusing Agent</i>	CFAV
	Especie propuesta	<i>Tamana bat</i>	TABV

Tabla 2. Clasificación taxonómica de los virus pertenecientes al género *Flavivirus*. Se muestran el vector al que se asocia su transmisión, el secoplejo al que pertenecen, la especie viral y la abreviatura correspondiente. Con sangría se muestran los subtipos descritos para cada especie.

Los recientes estudios filogenéticos han establecido grupos que globalmente correlacionan bien con los grupos antigénicos. La mayoría de los análisis filogenéticos se han realizado en la proteína E, pero también se han realizado en los genes NS3, NS5 y en la secuencia completa del virus (la cual en la mayoría de los flavivirus no está disponible, sólo en los virus que son altamente patógenos para el hombre y de los cuales sí se han aportado más datos)(Zanotto y cols., 1996).

Desde un punto de vista epidemiológico hablamos de tres grupos de flavivirus, aquellos de vector desconocido (UNKV) que se cree que perdieron el vector al dejar de necesitarlo para su replicación y los virus con vector artrópodo, los cuales puede ser garrapatas (TBV) o mosquitos (MBV). Los análisis filogenéticos realizados hasta la fecha sugieren dos hipótesis en la evolución de los flavivirus:

- Gen NS5 y de la envuelta.- De un antepasado común evolucionaron primero los virus con vector y sin vector, tras lo cual de los de vector divergieron los de mosquito y garrapata
- Gen NS3 y genoma completo. – De un antepasado común divergieron por un lado los TBV y UNKV y por otro lado los MBV.

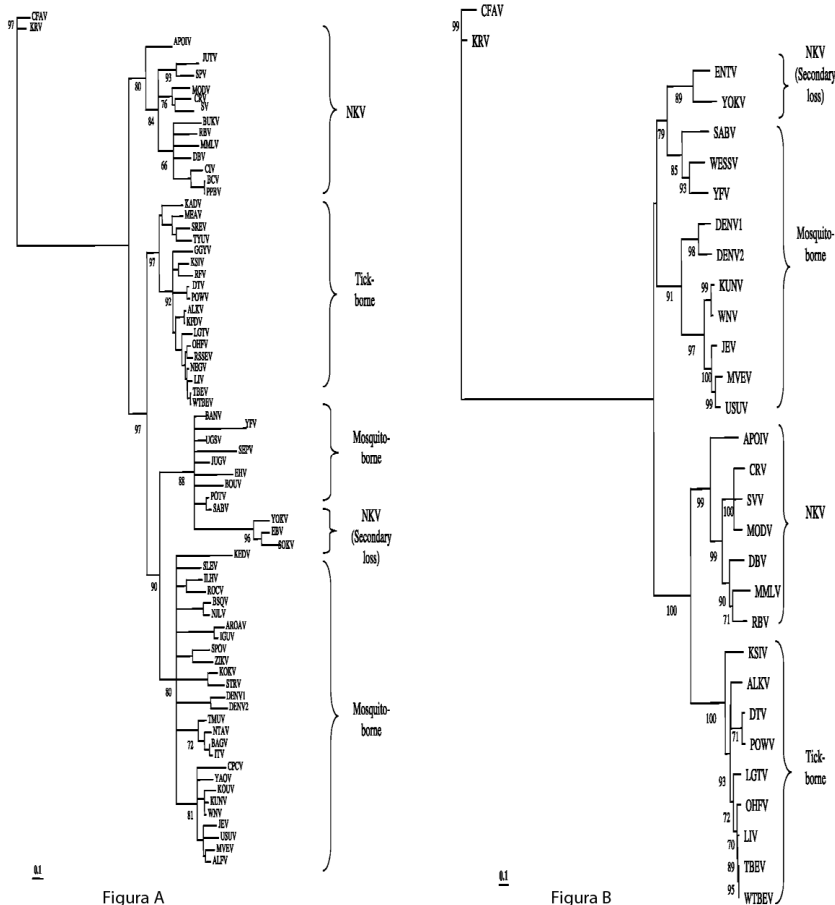


Figura 4. Árboles filogenéticos que explican las dos hipótesis evolutivas descritas para el género *Flavivirus*. La figura A muestra el análisis realizado en el gen de la NS5 y de la envuelta y la figura B en el gen NS3 y genoma completo. Adaptado de Cook, 2005.

Ambas hipótesis parten del hecho de que de un antepasado común, el género evolucionó a dos grupos principales de virus, unos que conservaron el vector (TBV y MBV) y otros que no lo conservaron o que en la actualidad no se conoce (UNKV), pero lo que aún es incierto es el orden de esta separación. En los virus que necesitaron vector para llevar a cabo su transmisión, hubo una co-evolución con el mismo, mosquito o garrapata. Ninguna de las dos hipótesis tiene actualmente suficiente rigor científico, ya que los datos difieren dependiendo de la región genómica en la que se hace el estudio filogenético (Cammisa-Parks y cols., 1992, Marin y cols., 1995, Kuno y cols., 1998, Billoir y cols., 2000, Gaunt y cols., 2001, Gould, 2002, Cook y Holmes, 2005).

Aparte de estos “flavivirus clásicos” hay dos especies propuestas dentro del género. Una la representa el virus Tamana bat (TABV). Se aisló en 1973 de la saliva, glándulas salivares y bazo del murciélago bigotudo *Pteronotus parnellii*. Este virus comparte muchas características con los flavivirus, incluyendo una similar organización genómica y algunos motivos hidrofóbicos, enzimáticos y de unión de la poliproteína conservados. Comparte además otras características generales de los arbovirus como

son la sensibilidad al éter, ser patógeno para los ratones lactantes y tener la habilidad de hemaglutinar eritrocitos de ganso, pero no se le ha encontrado relación serológica con los arbovirus hasta ahora conocidos (Price, 1978). Suele utilizarse como grupo externo (*outgroup* o raíz) en los árboles filogenéticos, aunque algunos autores consideren que es demasiado diferente genéticamente y es mejor excluirlo. La otra especie es el CFAV, que se detectó en 1975 por casualidad en una línea celular de *Ae. aegypti* sin infectar, y al hacer un pase de la misma a una de *Ae. albopictus*, se observó una fusión masiva en las células. El estudio de este fenómeno mostró que era producido por un flavivirus cuyo nombre obedece al efecto celular observado (CFA- *cell fusing agent* - agente de fusión celular). Parece que este virus no tiene capacidad de replicar en líneas celulares de vertebrados y que no comparte sitios antigénicos con ningún otro flavivirus. Los estudios filogenéticos sugieren la divergencia de este virus de un ancestro común, antes de la evolución del resto de los flavivirus que hoy se conocen. De hecho una de las hipótesis sobre el origen de los flavivirus actuales postula, que los flavivirus transmitidos por artrópodo evolucionaron de los virus propios de insecto, y que CFAV puede representar el estado en la evolución de los flavivirus cuando tenían sólo un hospedador insecto, lo que se traduciría en que el primer flavivirus fue un virus de insecto (Cammissa-Parks y cols., 1992). Además cabe destacar la identificación de otro flavivirus de insecto, el virus del Rio Kamiti (en inglés *Kamiti River*, KRV) detectado en 2 lotes de *Ae. macintoshi* en Kenia, genéticamente muy similar a CFAV, aunque no produce fusión celular (Crabtree y cols., 2003, Sang y cols., 2003). Pero más sorprendente ha sido la reciente observación de que estos dos virus tienen la capacidad de integrar su ARN en el genoma de células de mosquitos en forma de ADN, observándose tanto en líneas celulares de mosquito como en mosquitos en la naturaleza. Específicamente, se ha visto un ORF codificante de 1557 aminoácidos relacionado con KRV y CFAV (CSA, del inglés *Cell Silent Agent*), tanto en células C6/36 de varias líneas celulares como en mosquitos *Ae. Albopictus* (mosquitos en la naturaleza y de laboratorio) en Tailandia, Texas, Camerún, Madagascar, Japón e Italia; y otra secuencia diferente pero también relacionada con CFAV y KRV, en el genoma de *Ae. aegypti* (CSA2) tanto en mosquitos de Senegal, como en la línea celular A20 de *Ae. aegypti*. Por último se han visto otras secuencias de flavivirus cuyos genes estaban truncados o tenían insertados codones de terminación (Tabla 3). Todas estas secuencias probablemente resultaron de dos o más eventos de integración independientes, tras la infección de cada mosquito por uno o más virus relacionados con el grupo de CFAV (Crochu y cols., 2004). Recientes investigaciones nos revelan la existencia de una nueva cepa de CFAV (cepa Culebra) en *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Culex. spp.* en Puerto Rico (Cook y cols., 2006). Y de un nuevo virus de mosquito detectado en *Culex pipiens* y otros *Culex* en Japón (llamado *Culex flavivirus*, CxFV) que en estudios filogenéticos en el gen de la envuelta demostró estar claramente separado y diferenciado de los flavivirus de insecto asociados a los mosquitos *Aedes*. Presumiblemente los flavivirus de insecto asociados a mosquitos *Culex* y *Aedes* han evolucionado independientemente (Hoshino y cols., 2007). Se cree que la evolución, patrones de dispersión y algunas características epidemiológicas de los flavivirus, han sido determinadas por una combinación de restricciones impuestas por la adaptación al vector artrópodo, al hospedador vertebrado, la ecología asociada y la influencia de la actividad comercial humana.

Cepa	Año detección	Origen	Especie mosquito	Integración genoma
CFAV	1975	Línea celular	<i>Ae. aegypti</i>	No
KRV	1999	Kenia	<i>Ae. macintoshi</i>	No
CSA	2004	Tailandia, Texas, Camerún, Japón, Madagascar, Italia	Línea celular C6/36 y mosquitos <i>Ae.</i> <i>albopictus</i>	NS1-NS4B (1557 aa)
CSA2	2004	Senegal	<i>Ae. aegypti</i> y línea celular A20	NS5 (490 aa)
CFAV Culebra	2002	Puerto Rico	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae.</i> <i>albopictus</i> y <i>Culex</i> sp.	No
CxFV	2003	Tokio	<i>Culex</i> sp.	No

Tabla 3. Resumen de los flavivirus propios de insecto descritos hasta la fecha.

En cuanto a la **filogenia de los flavivirus**, la mayoría de ellos pertenecen a un único grupo filogenético antigénicamente relacionado, dentro del cual los virus se distribuyen en diferentes ramas de acuerdo a la naturaleza de su vector artrópodo (desconocido, garrapatas o mosquitos), asociación epidemiológica del virus y asociación a la enfermedad producida por los mismos. Estos grupos, podrían ser a su vez subdivididos en sub-grupos, definidos por su hospedador vertebrado (aves y/o mamíferos)(Figura 5)(Gaunt y cols., 2001):

Los flavivirus transmitidos por mosquitos (MBV) revelan dos grupos epidemiológicos distintos:

- virus neurotropos- a menudo asociados con encefalitis en humanos o ganado, y relacionados con la especie *Culex* como vector y aves como hospedador
- virus viscerotropos- asociados con enfermedad hemorrágica en humanos y relacionados con la especie *Aedes* como vector y primates como hospedador

Los flavivirus transmitidos por garrapatas (TBV) también forman dos grupos distintos dependiendo de cual sea el hospedador:

- asociado con aves marinas
- asociado con mamíferos (roedores y murciélagos), al que pertenecen los virus del complejo de la encefalitis transmitida por garrapatas

Los flavivirus de vector desconocido (UNKV) forman 3 grupos diferentes:

- uno agrupado en la rama de los MBV y asociado con murciélagos, que se cree que eran MBV que han sufrido una pérdida secundaria del vector
- otro genéticamente más distante también asociado a murciélagos
- otro asociado a roedores

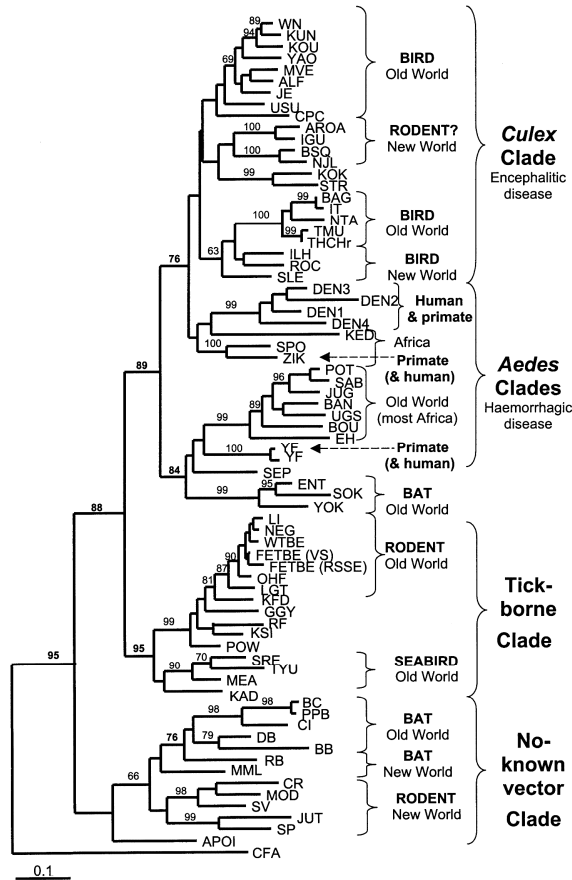


Figura 5. Árbol filogenético del género *Flavivirus* basado en el gen NS5. Se muestran los principales vectores y hospedadores para cada virus, así como la enfermedad a la que están asociados.

Adaptado de Gaunt, 2001.

Aunque se observa esta relación con el vector, muchos flavivirus se han aislado también de otros artrópodos diferentes a su vector principal, como es el caso, entre otros, de YFV que se asocia normalmente a *Aedes* spp. pero que ha sido también aislado de garrapatas (Monath y Heinz, 1996). Este amplio rango de hospedador invertebrado podría reflejar la progresiva adaptación del virus a su vector principal, pero también una conservación para algunas especies de caracteres genéticos heredados de un antepasado común que permitiese la infección de un gran rango de hospedadores y vectores (Billoir y cols., 2000). Haciendo un análisis filogenético en el gen de la envuelta, se ha observado que hay diferencias evolutivas entre los MBV y los TBV. La primera diferencia es que los MBV han evolucionado al doble de velocidad que los TBV, que podría explicarse por la diferencia en el ciclo de vida de estos artrópodos. Las garrapatas infectadas pueden sobrevivir largos periodos sin alimentarse y durante este tiempo, el virus es mantenido a bajos niveles de infectividad, implicando un bajo grado de replicación viral. En cambio, cuando los mosquitos pican para obtener alimento, se infectan y replican el virus a altos títulos en pocos días y lo transmiten a otros

vertebrados susceptibles lo que hace que el virus tenga un mayor grado de replicación y dispersión (Marin y cols., 1995). De este análisis también se ha podido observar otra clara diferencia y es que en los TBV ha habido un proceso evolutivo continuo y asimétrico con progresión gradual por el hemisferio norte, y en los MBV hubo una explosión radial en los últimos 200 años con una primera fase de crecimiento lento y otra después de crecimiento rápido. Esto se ha observado sobre todo en el virus dengue porque el hombre es el hospedador y éste en los últimos años se ha movido por todo el mundo, transportando el virus a zonas nuevas. Sin embargo esta expansión de las poblaciones humanas ha tenido menos efecto en la transmisión de los TBV, pues los humanos son siempre hospedadores finales. La distinción entre los dos grupos de virus probablemente refleja diferencias en los modelos de dispersión, propagación y cambios en el tamaño de las poblaciones de hospedadores (Zanotto y cols., 1996).

Los flavivirus conocidos divergieron de un ancestro común hace entre 5.000 y 10.000 años y su evolución ha estado acompañada por el desarrollo de la civilización humana y de las prácticas agrícolas y ganaderas de los últimos 10.000 años. Sea cual sea la región analizada, CFAV y TBAV aparecen como grupos marcadamente distantes. Al estar muy relacionados a los flavivirus, podrían representar la unión evolutiva entre los géneros pestivirus y flavivirus, representando CFAV un linaje basal del género y apoyando la teoría de que los virus transmitidos por artrópodo, habrían evolucionado de los virus de insecto, siendo CFA y KRV hasta la fecha sus únicos representantes (Gould y cols., 2003). Así el aislamiento de nuevas cepas o de nuevos virus de insecto permitiría obtener datos adicionales para hacer comparaciones genéticas y proporcionar nuevas oportunidades para las investigaciones en evolución y filogenia flaviviral. La correlación entre epidemiología, enfermedad y biogeografía comienza a definir unas complejas relaciones evolutivas entre el virus, el vector, el hospedador vertebrado y el nicho ecológico.

3 VIRUS WEST NILE

3.1 Introducción

El virus West Nile es el arbovirus más ampliamente distribuido en el mundo, ya que está presente en todos los continentes excepto en la Antártida y en las últimas décadas ha cobrado gran importancia debido a su insospechada capacidad de invasión de nuevas áreas geográficas. Pertenece al Complejo Antigénico de la Encefalitis Japonesa, el cual incluye ocho especies víricas (Tabla 2). Son virus de gran interés en salud humana y están asociados principalmente a mosquitos del género *Culex* como vector principal, aunque se ha visto que otros mosquitos e incluso garrapatas, pueden estar implicados en su transmisión (Tablas 1 y 4)(Figura 6)(Gould, 2002).

VIRUS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	ASOCIACIÓN AL VECTOR	ASOCIACIÓN A VERTEBRADO
Cacipacore	Brasil	Sin vector conocido	Aves, roedores, murciélagos y humanos
Encefalitis Japonesa	Asia y Australia	<i>Culex</i> sp., <i>Aedes</i> (<i>Ae</i>) sp., <i>Anopheles</i> (<i>An</i>) <i>barbirostris</i> , <i>An. Hyrcanus</i>	Aves, caballos, cerdos, roedores, animales domésticos y humanos
Koutango	Senegal y República Central Africana	<i>Ae. aegypti</i>	Humanos y roedores
Encefalitis de Murray Valley	Australia y Nueva Guinea	<i>Culex</i> sp., <i>Ae. normanensis</i>	Caballos, humanos, perros, zorros, aves y animales domésticos.
Alfuy subtipo de MVEV	Australia	<i>Culex</i> sp., <i>Aedeomyia catasticta</i>	Aves, roedores y humanos
Encefalitis de Saint Louis	Norte, sur y centro de América y Canadá	<i>Culex</i> sp., <i>Aedes</i> sp., <i>Anopheles</i> sp., <i>Sabethes</i> sp., <i>Trichoprosopon</i> sp.	Aves, zorros, murciélagos y humanos
Usutu	Sudáfrica, República Central Africana, Camerún, Centro Europa	<i>Culex</i> sp.	Ganado vacuno, ovejas, aves, humanos y roedores
West Nile	África, Europa, Rusia, Oriente Medio, Asia, India y USA	<i>Culex</i> sp., <i>Aedes</i> sp., <i>Anopheles</i> sp., <i>Argas hermanni</i> , <i>Hyalomma plumbeum</i>	Aves, humanos, camellos, murciélagos, caballos y roedores entre otros
Kunjin subtipo de WN	Australia	<i>Culex</i> sp.	Ganado vacuno, aves, humanos y caballos
Yaounde	Camerún y República Central Africana	<i>Culex</i> sp., <i>Aedes</i> sp., <i>Eretmapodites oedipodeios</i> ,	Aves y roedores

Tabla 4. Resumen de algunas de las características de los virus pertenecientes al complejo antigénico de la Encefalitis Japonesa. Adaptado de Gould, 2002.

WNV es un claro ejemplo de emergencia viral en zonas nuevas y de re-emergencia en zonas donde ya se sabía que circulaba. Históricamente WNV ha sido considerado como uno de los virus menos virulentos de este complejo serológico, sin embargo las recientes epidemias que se han asociado a una enfermedad neuro-invasiva grave y mortal, han cambiado esta percepción. El virus se aisló por primera vez en 1937 de la sangre de una mujer con síndrome febril en la provincia de West Nile, al norte de Uganda (de ahí su nombre “virus del Nilo Occidental” en castellano, o West Nile virus (WNV) en inglés)(Smithburn y cols., 1940), y posteriormente se aisló de pacientes, aves y mosquitos en Egipto a principios de los años 1950 (Taylor y cols., 1956). Cabe destacar que durante las dos últimas décadas, los brotes (en humanos y en caballos) han aumentado tanto en número como en gravedad de la enfermedad. Hasta el año 1999, WNV se distribuía exclusivamente en el Viejo Mundo, pero en ese año se detectó por primera vez en el continente Americano en la ciudad de Nueva York, y a partir de ahí el virus ha sido capaz de extenderse por todo Norte América, sur de Canadá, Centroamérica, islas del Caribe y recientemente también en Sudamérica. Durante esta expansión el virus ha causado decenas de miles de infecciones humanas confirmadas, con miles de muertos sólo en los Estados Unidos. Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a este virus como emergente en América desde 1999 y re-emergente en Europa desde 1996 (<http://www.who.int>).



Figura 6. Distribución geográfica de los flavivirus más patógenos para el hombre del complejo antigénico de la JE. El sombreado gris corresponde a la distribución de WNV y los círculos a la de SLEV, JEV y MVEV.

3.2 Distribución y brotes epidémicos

WNV ha sido descrito en África, Asia, Europa, Oriente Medio, India, Australia (donde se le ha dado el nombre de virus Kunjin, KUNV) y en el continente Americano (Figura 6). Desde que se aisló por primera vez, los brotes en humanos han sido poco frecuentes, siendo los más notables los de Israel en la década de los años 1950 con cientos de casos y la epidemia de Sudáfrica de 1974 con 18.000 infecciones en humanos en un área de 2.500 km² (Murgue, 2002). Desde 1975 hasta 1993 no se han documentado epidemias debidas a este virus.

En **Europa** en 1958 se identificaron por primera vez anticuerpos específicos para WNV en la sangre de dos ciudadanos albaneses, pero los primeros aislamientos víricos datan de 1963, de pacientes y mosquitos de los deltas del Ródano en Francia debido a una epidemia ocurrida entre 1962 y 1963. En el delta del Volga se detecta también en humanos y garrapatas durante la década de los 60. Además de en Francia y Rusia, el virus ha sido aislado posteriormente en Portugal (1972), Eslovaquia (1974), Moldavia (1974), Ucrania (1975), Hungría (1976), Rumania (1996), República Checa (1997) e Italia (1998). Además, se han detectado anticuerpos frente al virus en humanos en Armenia, China, Borneo, Georgia, Irak, Kenia, Líbano, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Siria, Sudán, Tailandia, Túnez, España, Portugal y Turquía (Hubalek y Halouzka, 1999). Con respecto a la incidencia de la fiebre de WNV en Europa hay que decir que es poco conocida. En la década de 1960 se observaron casos en el sur de Francia, sur de Rusia, sureste de Rumania, España y desde entonces se han venido observando casos en Bielorrusia, Ucrania, sureste de Rumania y República Checa. La fiebre de WNV en Europa ocurre

entre los meses de julio y septiembre ya que es el período de máxima actividad de los vectores.

Las pocas epidemias en humanos documentadas antes de 1996 generalmente se dieron en poblaciones rurales y con pocos casos de enfermedad neuroinvasiva (Hayes, 2001). Sin embargo, al empezar la década de los años 1990, los brotes tanto en humanos como en caballos empezaron a ocurrir más frecuentemente, especialmente en la cuenca del Mediterráneo, asociados a un incremento en el número de casos, a un incremento en la gravedad de la enfermedad y a altas tasas de mortalidad aviar. En nuestro ámbito geográfico se han reconocido brotes en Argelia en 1994, Rumania y Marruecos en 1996, Túnez en 1997 y 2003, Italia en 1998, Rusia en 1999, Israel en 1999 y 2000, Francia en el 2000 y 2003 (Marfin y Gubler, 2001, Petersen y Roehrig, 2001)(Tabla 5). La enfermedad por WNV empezó a considerarse importante y grave en humanos, al menos en Europa, cuando en 1996 se dio la gran epidemia de Rumania (Tsai y cols., 1998). En ganado equino se han registrado brotes epizooticos de la enfermedad, que van desde una fiebre a una encefalomiелitis con un rango de mortalidad que varía desde moderado a alto. En la Camarga francesa, hubo un brote que afectó a 473 caballos entre los años 1962 y 1963, de los cuales del 25 al 30% murieron, y en 1965 se confirmó la infección en tres caballos con síntomas neurológicos, siendo fatal uno de ellos del cual pudo aislarse el virus. En Portugal en 1971 se registró una epizotía de encefalitis en equinos (Filipe y cols., 1973). Desde esta fecha hasta el año 1996 no se ha registrado ninguna infección por WNV en Europa.

PAIS	AÑO	ENFERMEDAD	Nº MUERTES	CITA
Rumania	1996	400 infecciones NE/H	40	(Tsai y cols., 1998)
Marruecos	1996	1 caso H		(Schuffenecker y cols., 2005)
	2000	94 casos E	42	
	2000	9 NE/E		
República Checa	1997	5 casos H		(Hubalek y cols., 1998)
Túnez	1997	173 casos NE/H	8	(Murgue y cols., 2001a)
Italia	1998	14 NE/E	6	(Cantile y cols., 2000)
Israel	1999	2 casos H		(Giladi y cols., 2001)
	2000	439 casos H	29	(Hindiye y cols., 2001)
		75 NE/E	15E acompañado de ↑ mortalidad aves	(Banet-Noach y cols., 2003)
				(Steinman y cols., 2002)
Camarga francesa	2000	76 NE/E	21	(Murgue y cols., 2001b)
	2003	Infecciones E		(Zeller y Schuffenecker, 2004)
	2004			
Volgogrado (Rusia)	1999	800 casos H	40	(Platonov y cols., 2001)
	2000	56 casos H	5-10%	
	2001	64 casos H	5-10%	(Zeller y Schuffenecker, 2004)

Tabla 5. Resumen de los brotes de enfermedad por WNV más recientes ocurridos en Europa tanto en el ser humano como en el ganado equino. H=humano, E=equino, NE=neurológico.

Es notable la rápida extensión de WNV por toda **América** (Tabla 6). En 1999 fue aislado en Nueva York por primera vez en este continente, y de ahí se ha extendido prácticamente por todo el territorio. El avance ha sido progresivo y se ha extendido de costa a costa propagándose también por el sur de Canadá, Latinoamérica e islas del Caribe. El virus ha ido infectando a humanos, caballos y aves a lo largo de toda su expansión. El primer aislado de WNV en América, a partir de un flamenco chileno de un zoológico de Nueva York, es prácticamente idéntico genéticamente a un WNV aislado a partir de un ganso afectado durante el brote israelí de 1998 (Malkinson et al, 1998; (Lanciotti y cols., 1999), lo que indica que la epidemia americana tiene su origen en el Viejo Mundo. En el verano de 1999, se detectó enfermedad neurológica grave en humanos producida por WNV, confirmándose simultáneamente en unos 20 caballos con encefalitis en Long Island (Trock y cols., 2001). En este primer brote que afectó tanto a humanos como a caballos, pudo observarse, como en el caso de Israel en el año 2000, una alta mortalidad en aves, en particular en cuervos, precediendo a los informes de enfermedad de humanos y caballos. A pesar de las bajas temperaturas, el virus fue capaz de pasar el invierno en diapausa en mosquitos adultos del género *Culex* (Nasci y cols., 2001) y la infección no desapareció, pudiendo detectarse a finales del año 21 casos humanos, 63 equinos, 4.304 aves muertas infectadas y otros seis mamíferos infectados en un total de siete estados al este de EEUU. Hasta el 2001 se confirmaron en el laboratorio 738 infecciones en caballos. En 2002 se reportaron cerca de 15.000 encefalitis en equinos (muchos de los casos ocurrieron en Canadá) y más de 4.000 casos humanos acompañados de 284 muertos. Ya en 2003 la cifra de casos en humanos sobrepasó los 7.700 con 166 muertos, informándose también más de 4.000 encefalitis en caballos de 41 estados. Pero es a partir de este año cuando el número de casos en humanos superó el de caballos, debido seguramente a la aplicación de la vacuna en equinos (Castillo-Olivares y Wood, 2004, Zeller y Schuffenecker, 2004). Hasta diciembre de 2007 se contabilizaron 27.551 casos humanos y 1.077 muertes (CDC, <http://www.cdc.gov>). La expansión hacia el sur del continente se notificó por primera vez en el 2001 en las islas Caimán con la detección del virus en un paciente que no había viajado en los seis meses anteriores a la infección (O'Leary y cols., 2002).

PAIS	AÑO	ENFERMEDAD	CITA
Islas Caimán	2001	1 caso H	(O'Leary y cols., 2002)
El Salvador	2002	Se detectaron anticuerpos (Ac) en aves residentes y E	(Cruz y cols., 2005)
Jamaica			(Dupuis y cols., 2003)
Rep. Dominicana			(Komar y cols., 2003b)
Guadalupe			(Quirin y cols., 2004)
México			(Cruz y cols., 2005)
Bahamas	2003	Seroprevalencias en H, E y aves.	(Blitvich y cols., 2003)
Puerto Rico			(Maritza y cols., 2006)
Cuba			
México		Aislamiento de un cuervo muerto	(Estrada-Franco y cols., 2003)
		Anticuerpos en E	
		1 caso NE/E	
México	2004	Aislamiento de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	(Blitvich y cols., 2004),
Cuba		Enfermedad febril H	(Elizondo-Quiroga y cols., 2005)
Puerto Rico		Ac en aves	(Mattar y cols., 2005).
Trinidad		Ac en aves y E	
Colombia		Ac neutralizantes en E y patos domésticos	
La Habana	2005	Ac neutralizantes en E	
Cuba		Ac en E	(Komar y Clark, 2006)
Argentina	2006	Infecciones en H	
Venezuela		Aislamiento de cerebro de 3 E muertos	(Morales y cols., 2006)
		Ac neutralizantes en aves y E	(Bosch y cols., 2007)

Tabla 6. Resumen de la expansión realizada por WNV hacia el sur del continente americano. H=humano, E=equino, NE=neurológico.

La expansión y aumento en la incidencia del virus, parecen deberse a causas de naturaleza antropogénica (cambio climático, incremento en la circulación de personas y mercancías, etc.). Existen diferencias importantes en el patrón epidemiológico de la circulación del virus en América del Norte y en Europa, o incluso en América tropical: a) el virus ha avanzado continua y rápidamente por toda América del Norte, mientras que en Europa ha quedado confinado en brotes localizados y no recurrentes; b) la afectación en seres humanos es mayor en la epidemia americana, y c) la patogenicidad en algunas especies de aves es muy superior a la observada en Europa. Estas diferencias podrían deberse a factores intrínsecos a la propia variante del virus o bien a factores ambientales propios de cada zona. Una de las posibles causas podría deberse a una falta de inmunidad frente al virus en las aves en América (confiriendo al virus la capacidad de desarrollar altas viremias en las aves facilitando el establecimiento de un eficaz ciclo biológico del mismo) combinado con la evolución a cepas más virulentas. El hecho de que en América tropical la incidencia y expansión del virus siga un patrón diferente, podría deberse a una reducida virulencia del virus en los trópicos, ya que algunas variantes del virus replican mal a elevadas temperaturas, o a una menor competencia de los vectores y hospedadores (al haber una gran diversidad de los mismos). Las cepas aisladas en México han demostrado tener una reducida replicación en las aves y podría ser la causa de que haya disminuido el número de casos de infección en humanos en Latinoamérica (Reisen y Brault, 2007, Kramer y cols., 2008).

En **España** hay estudios serológicos previos que indican la presencia de anticuerpos frente a WNV u otros arbovirus en roedores de diferentes áreas del norte (Huesca, Teruel y Zamora) y sur del país (Ronda y Badajoz) (Chastel y cols., 1980) y en muestras humanas con títulos elevados en Valencia (Sanchis-Bayarri Vaillant, 1974), Galicia (16 %), (Garea-González y Filipe, 1977), los alrededores del Coto de Doñana (Filipe y de Andrade, 1990) y en el Delta del Ebro (8 %) (Lozano y Filipe, 1998). Los resultados obtenidos en Galicia y el Delta del Ebro hicieron suponer la existencia de brotes epidémicos de infección por WNV en esas regiones durante los años sesenta y finales de los setenta respectivamente y sugirieron que el virus circuló activamente en las poblaciones humanas asentadas en las áreas de riesgo.

Cabe destacar que España posee características geográficas y ecológicas que hacen probable la circulación y asentamiento de WNV y de otros arbovirus (Filipe y de Andrade, 1990). Estas características son:

1. presencia de vectores y hospedadores competentes junto a la existencia de grandes territorios (humedales) donde los virus pueden ser introducidos y establecer su ciclo natural sin mostrar ningún signo visible de su presencia y actividad
2. proximidad y continuidad geográfica con el norte de África que la permite ser una vía de paso de las aves migratorias entre Europa y África

Por otra parte, caben destacar los hallazgos del virus tanto en caballos, humanos, aves, animales domésticos y mosquitos en países vecinos como son Portugal (Filipe y Pinto, 1969, Filipe, 1971, Filipe, 1972, 1974, 1975, Esteves y cols., 2005), Francia (Giudice y cols., 2004) y Marruecos (Schuffenecker y cols., 2005) y los brotes descritos anteriormente por toda la cuenca del Mediterráneo ocurridos en los últimos años. Pero sobre todo es importante resaltar los recientes estudios serológicos realizados con muestras humanas, de aves y de caballos en nuestro país, en los cuales se han empleado el test de ELISA, que es una técnica más específica que la IH (utilizada hasta la fecha) y también se han utilizado las neutralizaciones virales como técnica serológica para la identificación específica del virus (Figura 7).

A principios de esta década se iniciaron los estudios de aves en Doñana. En el año 2003 se estudiaron pollos de aves acuáticas residentes, en los que se detectaron anticuerpos neutralizantes frente al virus en diferentes especies, aunque con un título bajo, lo que indicó una posible transmisión materna de los mismos con una prevalencia que varió entre el 1,9 y el 17,9 % según la especie (Figueroa y cols., 2007b). Además se realizó una encuesta serológica en la focha común (*Fulica atra*), ave escasamente migratoria, durante los años 2003, 2004 y 2005, en la que se observó una prevalencia de anticuerpos neutralizantes mayor en el año 2003, que en el 2004 y más baja aún en el 2005 (21 %, 16,7 % y 8,8 % respectivamente). Algunas aves seroconvirtieron en menos de un año tras su primera captura, lo que sugirió la circulación local del virus en esta zona (Figueroa y cols., 2007a). Finalmente en un estudio realizado en el 2004 en diferentes especies de aves capturadas en Sevilla, se observó que las aves migratorias presentan mayores títulos de anticuerpos neutralizantes que las aves residentes, lo que sugirió la existencia de un ciclo selvático del virus en esta zona, introducido por las aves migratorias desde las áreas donde el virus es endémico (López y cols., 2008). También se estudiaron

sueros de águila imperial, endémica del suroeste de la Península Ibérica, capturadas en Castilla La Mancha entre los años 2001 y 2005. En este caso el virus se detectó tanto en aves sanas como enfermas, con una prevalencia del 23,8 % y mediante RT-PCR se detectó genoma de WNV por primera vez en España en tejidos y exudados orofaríngeos (Höfle y cols., 2007). El análisis de las secuencias obtenidas, reveló la presencia del linaje I de WNV en una zona seca del centro-sur peninsular donde no había evidencias previas de circulación (Jiménez-Clavero y cols., 2008).

En el año 2005 también se realizaron estudios serológicos en caballos y vacas en la región de Doñana. Los resultados mostraron que las vacas no estuvieron expuestas o son resistentes a la infección por WNV mientras que en los caballos se detectaron anticuerpos neutralizantes (8,3 %), sugiriendo de nuevo la existencia de actividad del virus en el sur del país (Jiménez-Clavero y cols., 2007).

En humanos también se han realizado estudios recientes que han generado resultados muy interesantes. El primero fue un estudio realizado en el año 2001 en Cataluña, en el delta del Ebro, en población humana de la zona. Se obtuvieron 38 muestras positivas por ELISA de un total de 992 (3,83 %), de las que sólo dos se confirmaron por neutralización (0,2 %), la muestra con títulos mas altos presentó además anticuerpos IgG e IgM, lo que confirmaría una infección reciente (Bofill y cols., 2006). Resultados similares se obtuvieron en un estudio llevado a cabo en Sevilla, donde de una prevalencia del 1 % en 504 sujetos incluidos en el estudio, el 0,6 % se confirmó por neutralización. Estos resultados apoyan firmemente la circulación pasada del virus, así como la exposición humana al mismo. En este mismo estudio, se han visto individuos con IgG frente a WNV sin anticuerpos neutralizantes, lo que podría deberse a una infección por otro flavivirus diferente a WNV pero antigénicamente relacionado (Bernabeu-Wittel y cols., 2007). En Huelva se realizó un estudio cuyo objetivo fue el de conocer si había evidencia serológica de infección por WNV en una población expuesta de forma frecuente a la picadura de mosquitos potencialmente vectores, como son los trabajadores del Servicio de Control de Mosquitos, que realizan su actividad laboral en las marismas maréales de los ríos Tinto, Odiel, Piedras, Carrera y Guadiana, y trabajadores de mantenimiento de carreteras que realizan sus tareas en zonas cercanas a las marismas (Pujol y cols., 2004). Se detectaron dos muestras positivas por ELISA a IgG y una dudosa, y no se llevó a cabo la neutralización para confirmar los resultados, por lo que la infección podría deberse a WNV o a otro flavivirus relacionado. En el año 2004 se describió el primer caso de enfermedad neurológica debida a WNV en España, en un caso de meningitis viral en un hombre de Badajoz, región próxima al Algarbe, Portugal donde se detectó el virus en 2004 en mosquitos y hubo dos casos humanos de enfermedad (Esteves y cols., 2005). En este caso se observaron tanto IgM como IgG positivas en sueros agudos y convalecientes, confirmados por neutralización viral. La mejora clínica fue espontánea y a los cinco días fue dado de alta (Kaptoul y cols., 2006). También este caso confirmaría la sospecha de que WNV está circulando en España. A la vista de los resultados, parece probable que éste u otro flavivirus estén circulando en ésta y otras zonas de riesgo del país, con algún impacto en la Salud Pública.

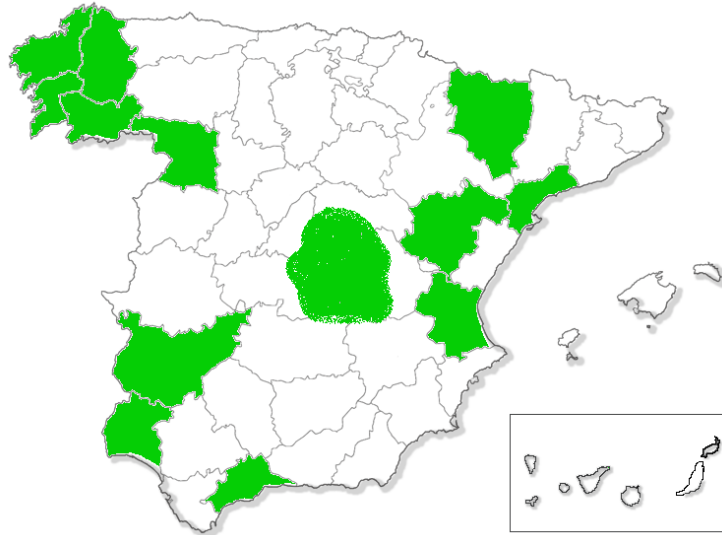


Figura 7. Representación geográfica de las seroprevalencias obtenidas en humanos, roedores, aves y caballos frente a flavivirus y WNV en España.

Además hay que destacar la reciente detección en Barcelona, en el año 2006, del virus Usutu en mosquitos *Cx. pipiens* (Busquets y cols., 2008), utilizando una metodología similar a la presentada en esta tesis doctoral. Los autores sugieren que el virus detectado es muy similar a la cepa africana, más que a la europea, y no parece haber tenido consecuencias clínicas en las aves de la zona. De ser así, el virus probablemente se haya introducido en la península desde África a través de aves migratorias. También en esta área geográfica del país, se detectó por primera vez en el año 2004, el mosquito *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta* sensu Reinert, 2004), conocido como mosquito tigre asiático (Aranda y cols., 2006). Es una especie invasora que se ha expandido por los cinco continentes en los últimos años, a través del comercio de neumáticos usados y productos de jardinería, donde en su interior se trasladan sus huevos, larvas y pupas. Originario del Sudeste asiático, es un vector competente de al menos 24 arbovirus, siendo susceptible a la infección de 26 arbovirus diferentes y dirofilariasis. Aparte de dengue y fiebre amarilla, este culicido puede transmitir otros flavivirus como WNV (Domingo y cols., 2007).

3.3 Filogenia

Se han descrito hasta la fecha cinco linajes diferentes del virus (Bondre y cols., 2007).

El **linaje 1** tiene una distribución mundial y puede afectar a humanos, caballos y aves. Dentro del mismo se pueden diferenciar dos sub-grupos: el **1a** que es africano-europeo-americano-asiático, y el **1b** que es australiano (virus Kunjin). Las epidemias europeas podrían haber sido iniciadas por las re-introducciones de variantes desde África

a Europa a través de las aves migratorias, y además las aves podrían también expandir el virus en la otra dirección, hacia el sur, durante su migración otoñal. La razón por la que no ocurren epidemias graves en vertebrados en África tropical aún no se conoce. La inmunidad en el hombre frente a ciertos linajes de WNV o virus relacionados, como Koutango, Yaounde o Usutu podría estar protegiendo en esa zona contra la enfermedad grave, aunque también podría explicarse por una inadecuada vigilancia y a una falta de datos acerca del potencial de la enfermedad por arbovirus en este continente (Botha y cols., 2008). Una alternativa a estas hipótesis sugiere que se habría seleccionado una estirpe más virulenta que estaría provocando los brotes epidémicos en el Mediterráneo (Murgue, 2002).

El **linaje 2** queda restringido a ciclos enzoóticos en África y Madagascar y afecta únicamente a animales, aunque se han descrito algunos casos de infección en humanos en Sudáfrica (Jupp, 2001, Burt y cols., 2002). Recientemente se ha detectado en Europa por primera vez, causando enfermedad neurológica grave en gavilanes y azores de Hungría (Bakonyi y cols., 2006, Erdélyi y cols., 2007). Estas cepas del linaje 2 tienen una delección de 12 nucleótidos en la proteína de la envuelta y una alta conservación genética. La estabilidad genética de estas variantes, sugiere que esa escasa evolución pueda ser debida a una baja presión selectiva, al mantenerse el virus en ciclos enzoóticos, siendo esos flavivirus enzoóticos menos virulentos para la población local que vive en zonas próximas (Murgue, 2002). Se han visto más cambios en diferentes zonas del genoma en cepas de este linaje que podrían estar involucradas en la diferente patogenicidad de las mismas, pero aún queda por relacionar los cambios en factores moleculares con la menor virulencia de la cepa.

El **linaje 3** está representado por una única cepa (Rabensburg 97-103) aislada de *Cx. pipiens* en 1997 en la República Checa (Bakonyi y cols., 2005) y el **linaje 4** por una cepa (Krnd88-190) detectada en la garrapata *Dermacentor marginatus* en Rusia en 1998 (Lvov y cols., 2004). No se sabe si estos virus son capaces de infectar al hombre y no se ha descrito hasta la fecha, enfermedad ni en aves ni en mamíferos.

El **linaje 5** ha sido descrito recientemente y está formado por aislados indios de los años 1955 a 1982 de diferentes hospedadores (*Culex* sp., *Anopheles* sp., murciélagos y humanos). Algunos de estos aislados estaban clasificados anteriormente como un tercer sub-grupo perteneciente al linaje 1 (1c), pero teniendo en cuenta estudios de neutralización de la infectividad viral, estudios filogenéticos con un mayor número de cepas y con el genoma completo de uno de ellos, se han visto variaciones genéticas y antigénicas suficientes como para definirlo como un nuevo linaje. Estos aislados son menos patogénicos que los del linaje 1 y han evolucionado independientemente en esta región ya que no existen rutas migratorias que unan el sur de la India con África ni Oriente Medio. Además se ha visto que estos virus han evolucionado muy poco y deben de ser mantenidos en ciclos enzoóticos dentro de la India (Bondre y cols., 2007).

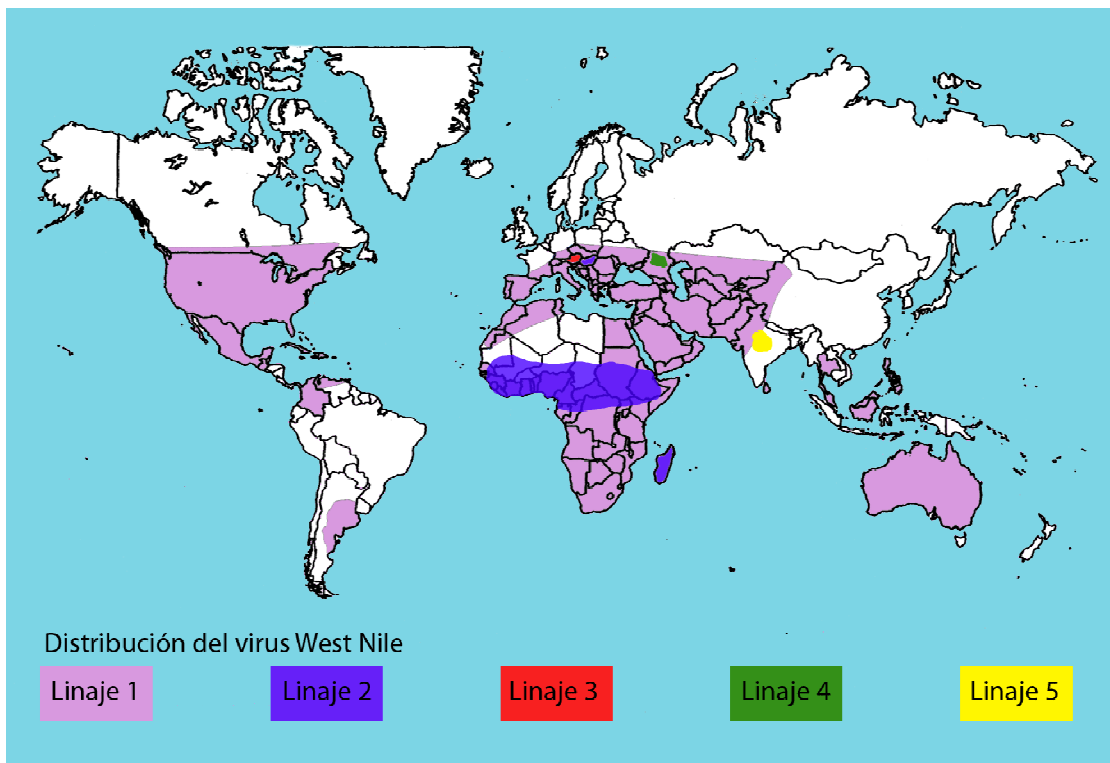


Figura 8. Distribución geográfica de los linajes de WNV.

Al principio se pensó que los KUNV eran una especie diferente a WNV, pero estudios posteriores mostraron que representaban un subtipo dentro de la especie WNV. Estudios de neutralización cruzada usando antisueros policlonales demostraron que los aislados recolectados en diferentes regiones de Australia eran todos antigénicamente indistinguibles entre sí. Por el contrario, KUNV aislado de *Cx. pseudovishnui* en Sarawak, Malasia en 1966 (**MP502/66**), mostró ser bastante distinto antigénicamente del resto, lo que sugirió su pertenencia a un linaje evolutivo distinto. Los estudios de secuenciación de aislados de KUNV obtenidos durante un periodo de 40 años de todas las regiones de Australia han confirmado que existe un único y restringido grupo genético con menos del 2 % en divergencia nucleotídica; además, los análisis de la secuencia del MP502/66 revelaron que era genéticamente distinto tanto de los virus KUNV australianos como de los WNV incluidos en el estudio, sugiriendo que este virus representaba un virus diferente dentro del grupo WNV/KUNV. Mientras los primeros informes sugirieron que podría representar una unión evolutiva entre los KUNV y WNV, la falta de identidad entre las secuencias de este virus y otros miembros del grupo WNV/KUNV sugirieron que evolucionaron separadamente de un ancestro común (Scherret y cols., 2001).

WNV es considerado un paradigma de virus emergente. Su introducción en Norte América en 1999 propició una oportunidad única para observar su evolución. Este virus (NY99), como ya se ha comentado anteriormente, guarda gran relación genética con el aislado de Israel de 1998 (Isr98) y se cree que éste es su origen (Lanciotti y cols., 1999), pero el modo de introducción aún no se conoce. Se han propuesto varias hipótesis, una de las primeras es que fue a través de aves migratorias, aunque actualmente se cree poco probable, ya que la distancia a recorrer por el ave es demasiado grande como para que la viremia del ave persista. Otras hipótesis más recientes sugieren la entrada a través de la importación de un animal, ser humano o mosquito infectado que llegase en transporte aéreo (Weaver y Barrett, 2004). Las cepas recolectadas durante la expansión del virus por EEUU fueron genéticamente homogéneas hasta el año 2003, en el que se reconoció que un genotipo dominante (WN02) diferente al NY99 estaba circulando y había remplazado al anterior (Davis y cols., 2005). Esta dominancia parece estar relacionada con el incremento en la eficiencia de la transmisión en mosquitos *Culex* spp, factor que habría favorecido la selección de una variante de entre las cuasiespecies circulantes (Jerzak y cols., 2005). En un estudio realizado en EEUU desde el 2002 al 2005 se ha visto que durante su expansión, el virus se ha ido diversificando y evolucionando (Bertolotti y cols., 2007).

3.4 Ciclo ecológico

El virus se mantiene en la naturaleza fundamentalmente en un ciclo enzoótico entre aves, sobre todo aves silvestres, y mosquitos ornitofílicos, principalmente del género *Culex*. Ocasionalmente el hombre, caballo y otros mamíferos pueden ser infectados y desarrollar enfermedad, actuando como hospedadores finales, ya que no producen viremia suficiente como para contribuir al ciclo de transmisión (Figura 9).

La circulación de WNV se ha visto fundamentalmente en dos tipos de ciclos:

- 1) **Rural o selvático.** Están implicadas aves y mosquitos ornitofílicos, como *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. modestus* y *Mansonia richiardii* y se caracteriza por ser un ciclo entre ave y mosquito.
- 2) **Urbano.** Están implicadas aves y los llamados “vectores puente”, que son mosquitos con afinidad similar para alimentarse tanto de aves como de mamíferos, como puede ser *Cx. pipiens molestus* en Europa.

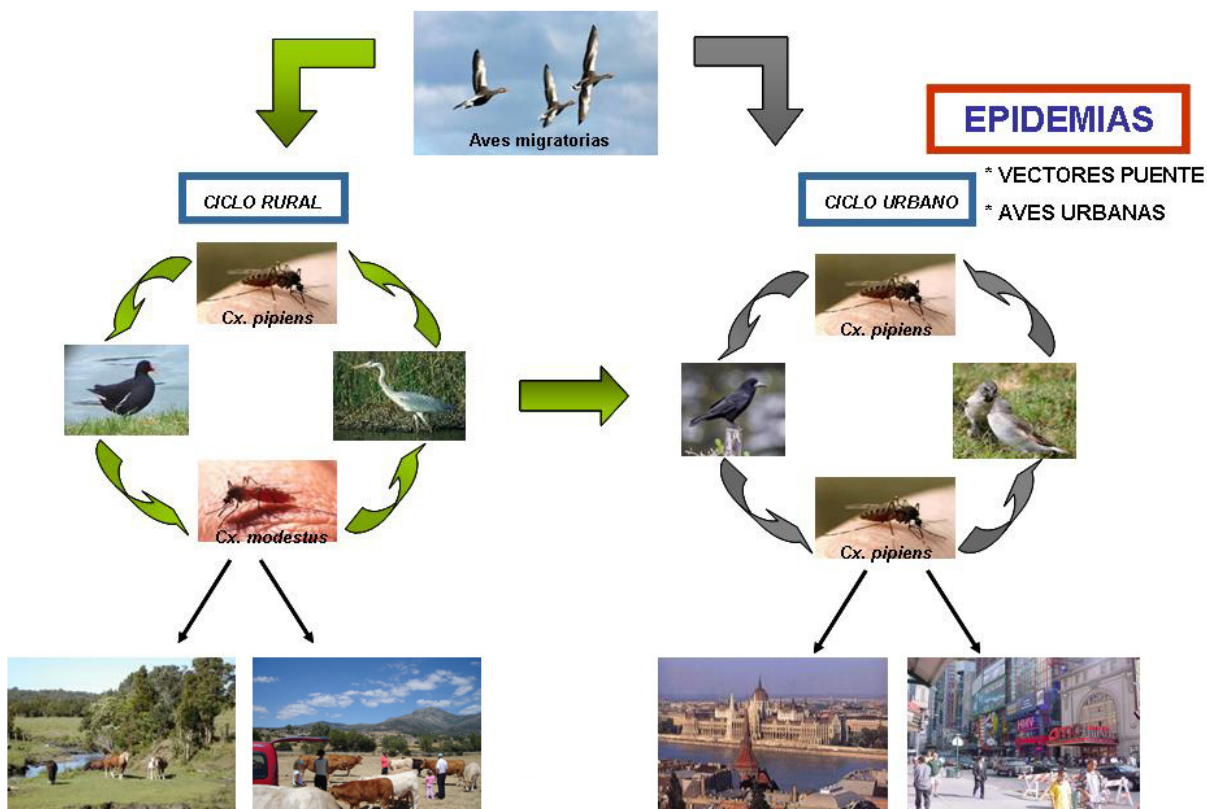


Figura 9. Ciclo biológico de WNV. A la izquierda se muestra el ciclo natural de mantenimiento del virus, y a la derecha el ciclo que se establece en las epidemias humanas registradas en los últimos años.

El ciclo natural de mantenimiento del virus es el rural, pero el urbano es el que se ha dado en las grandes epidemias descritas en Bucarest en 1996-1997 (Savage y cols., 1999) y Volgagrado en 1999 (Lvov y cols., 2000). El ciclo rural se da en la mayoría de humedales europeos de climas cálidos o templados. Estos focos de actividad del virus son generalmente silenciosos y permanecen indetectables, pero podrían activarse y expandirse bajo determinadas circunstancias y aumentar la circulación viral debido a factores favorables tanto abióticos (la temperatura, lluvias) como bióticos (aumento en las densidades de poblaciones de mosquitos competentes, y existencia de poblaciones de hospedadores susceptibles) (Hubalek, 2000). Los brotes en Europa se han asociado a la existencia de altas poblaciones de mosquitos (especialmente *Culex*), que han surgido tras grandes inundaciones, seguidas de tiempo seco y cálido (República Checa, 1997); y a la formación de hábitats de cría para los mosquitos, como es el agua acumulada y depositada tras las lluvias en alcantarillas y bajos de los bloques de pisos (Bucarest 1996-1997). Las aves migratorias son sospechosas de ser el principal hospedador introductor de WNV en nuevas áreas geográficas, debido a que los brotes del virus en regiones templadas generalmente ocurren a finales del verano o principios del otoño, coincidiendo con la llegada de grandes concentraciones de aves migratorias (Rappole y cols., 2000).

Las causas por las que el virus es capaz de reaparecer en un mismo lugar durante años consecutivos son múltiples. Una de las más importantes es que ha desarrollado varios **mecanismos para resistir a los inviernos fríos** y resurgir en la primavera, como es la hibernación del virus en el vector, donde sobrevive para el año siguiente iniciar un nuevo ciclo de infección (Nasci y cols., 2001, Reisen, 2006a). Además las hembras de mosquito pueden transmitir el virus transováricamente (Miller y cols., 2000, Goddard y cols., 2003), resultando infectados los mosquitos resultantes de estos huevos (Anderson y Main, 2006). También se ha observado la capacidad del virus de infectar garrapatas, y tal vez otros ectoparásitos, donde podría persistir por prolongados periodos hasta la siguiente alimentación de las mismas en los hospedadores (McLean y cols., 2002). Y además podría darse una transmisión continuada del virus en latitudes con temperaturas templadas en invierno, ya que parece ser que la temperatura mínima para la replicación del virus en el mosquito es de 14°C (Reisen, 2006b). Otra de las capacidades que posee WNV es la de **producir infecciones crónicas en aves**, manteniéndose así potencialmente infeccioso (Reisen y cols., 2005). Por último, cabe destacar el papel que desempeñan las **aves migratorias** en la diseminación del virus a nuevas áreas geográficas y en la repetida re-introducción en zonas templadas donde la transmisión es esporádica (McLean y cols., 2002). Se han encontrado anticuerpos y se ha aislado el virus en muchas de las especies de aves migratorias en Eurasia, viéndose además que éstas desarrollan una viremia suficiente como para infectar al mosquito vector y que el estrés debido a la migración, causa en ellas una inmunosupresión que hace que aumente la replicación viral (Rappole y cols., 2000).

3.4.1 Vectores

WNV se transmite por la picadura de mosquitos de más de cuarenta géneros diferentes, pero, como ya se ha mencionado, parece estar especialmente adaptado al género *Culex*. En África el vector más común es *Cx. univittatus*, en Europa *Cx. pipiens*, en India especies del complejo *Cx. vishnui*, en Asia *Cx. quinquefasciatus* y en Australia, KUNV es transmitido principalmente por *Cx. annulirostris*. En Norte América, se ha encontrado genoma del virus en más de 58 especies de mosquitos, pero *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* (especies urbanas) y *Cx. tarsalis* (especie rural) parecen ser los vectores más competentes para el hombre (Campbell y cols., 2002). Se han descrito también como vectores mosquitos de los géneros *Coquillettidia*, *Culiseta*, *Aedes* y *Anopheles* y en otros artrópodos hematófagos del género *Ornithodoros*, *Ryipicephalus* y *Haemophysalis*. Se cree que *Culiseta melanura* es importante en la amplificación entre aves al ser un insecto muy ornitofílico y que *Aedes vexans* juega un papel fundamental en la transmisión a mamíferos por su afinidad a los mismos (Molaei y cols., 2006). Muchos mosquitos *Culex* pueden actuar en determinados momentos como vectores puente, ya que pueden alterar sus patrones de alimentación y aunque tengan preferencia por alimentarse de aves, bajo determinadas circunstancias (en función de la densidad) pueden hacerlo de igual forma de mamíferos, facilitando así la extensión del ciclo viral pudiendo producir enfermedad en humanos y equinos (Kilpatrick, 2005).

El mosquito se alimenta de la sangre de un hospedador infectado, y el virus penetra en el intestino y replica en diferentes tejidos, tardando entre 8 y 14 días en ser infectivo y ser excretado en las glándulas salivares. En la siguiente alimentación del mosquito, inyecta el virus que lleva cargado en la saliva, en la sangre de los hospedadores de los que se alimenta (Girard y cols., 2005). Se estima que un mosquito infectado puede inocular al hospedador el orden de 10^4 unidades formadoras de placa (ufp) por picadura (Vanlandingham y cols., 2004) y que el virus produce una infección no citopática en el insecto.

3.4.2 Hospedadores

Los hospedadores naturales de la infección, y los mayores amplificadores del virus, son las aves silvestres, fundamentalmente las paseriformes. No se observa enfermedad clínica en la mayoría de las infecciones en aves, aunque se han descrito más de 200 especies susceptibles a la misma, siendo la duración y título de la viremia variable entre las diferentes especies (Komar y cols., 2003a). Los córvidos, gorriones y rapaces han demostrado ser muy sensibles a la infección (mayor amplificación viral y por lo tanto mayor viremia) y susceptibles de desarrollar la enfermedad, resultando mortal en muchos casos. Como son aves urbanas y periurbanas, representan un riesgo importante como desencadenantes de epidemias en humanos (Nasci y cols., 2002). En las aves, la infección por WNV puede afectar al corazón, riñón, bazo, intestino, glándulas adrenales, hígado y cerebro (Steele y cols., 2000). Aparte de la infección del ave por la picadura de un mosquito, en algunos estudios se han descrito otros posibles modos de infección: como son la transmisión por contacto y transmisión oral en diferentes especies durante el acicalamiento, ya que las aves infectadas eliminan grandes cantidades de virus a través de la cloaca y de las fosas nasales, lo que permitiría el contagio entre ellas en ausencia de mosquitos (Komar y cols., 2002); y la transmisión del virus a las aves insectívoras al alimentarse de mosquitos infectados (van der Meulen y cols., 2005).

El virus también puede llegar a infectar al hombre y caballo, pero a diferencia de las aves, esta transmisión se produce de forma indirecta y accidental, al no formar parte del ciclo natural de estos virus, ya que no alcanza un nivel de amplificación suficiente como para permitir que se de un nuevo ciclo de transmisión a través de los mosquitos. En la mayoría de las infecciones naturales en humanos, el virus es inoculado por vía intradérmica a través de la picadura de un mosquito infectado y replica en las células dendríticas próximas. Estas células infectadas migran a los nódulos linfáticos regionales y desde allí el virus entra en el torrente sanguíneo, dando lugar a una viremia primaria. Posteriormente el virus se disemina por el sistema reticulo-endotelial y llega a los tejidos periféricos donde produce un ligero aumento de la viremia (viremia secundaria), que sirve como foco de infección en la picadura del siguiente vector. El mecanismo preciso por el cual el virus entra en el sistema nervioso central (SNC) es aún desconocido, pero en infecciones experimentales se ha visto que la unión del ARN viral a un receptor celular tipo 3, produce el factor de necrosis tumoral que aumenta la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, permitiendo la entrada del virus y su invasión neuronal (Chambers y Diamond, 2003, Wang y cols., 2004). Una vez ha alcanzado el SNC, la progenie viral se

disemina entre las células por contigüidad y suele infectar neuronas, pero también células gliales del cortex cerebral, ganglios basales, cerebelo y médula espinal (Davis y cols., 2006b).

La infección por WNV se ha demostrado ocasionalmente en otros vertebrados salvajes como ardillas, cabras montesas, renos, alpacas, camellos, mofetas, focas, roedores, lobos, osos, caimanes y murciélagos, y en animales domésticos, como gatos y perros (Dauphin y cols., 2004), sin generar viremias elevadas a excepción de caimanes y una rana de lago en Rusia, que parecen ser hospedadores amplificadores eficaces al producir niveles de viremia suficientes como para infectar mosquitos, aunque su papel en el mantenimiento y amplificación del virus aún no se conoce (Hayes y cols., 2005a).

3.4.3 Rutas de transmisión en humanos

La mayoría de las infecciones en humanos son debidas a la picaduras de mosquitos, sin embargo se han descrito nuevos modos de transmisión a partir del 2002 en EEUU, como son las transfusiones de sangre, transplantes de órganos, la lactancia, transmisión intrauterina e infecciones accidentales adquiridas en trabajadores de laboratorio a través de inoculaciones intra-cutáneas y posiblemente por exposición a aerosoles (McLean y cols., 2002, Beasley, 2005). Estos nuevos modos de transmisión tienen importantes implicaciones para el control de la infección.

3.5 Patología y clínica

En recientes epidemias por WNV, el 80 % de las infecciones fueron asintomáticas, el 19 % presentó el síndrome febril, el cual puede llegar a ser grave pero que generalmente es auto-limitado, y en menos del 1 % de los casos dieron lugar a una enfermedad neuro-invasiva (Hayes, 2006). El inicio de la enfermedad es súbito, tras un período de incubación de 2 a 14 días tras la inoculación, y se caracteriza por un cuadro gripal con fiebre moderada o alta, cefalea, lumbalgia, artromialgia y cansancio o fatiga. Habitualmente, los síntomas son inespecíficos y de intensidad moderada, con presentación de un exantema en un 25-50 % de los pacientes. Raras veces la infección se ha manifestado con afectaciones extra-neurológicas como miocarditis, pancreatitis, hepatitis fulminante (Campbell y cols., 2002), fiebre hemorrágica (Paddock y cols., 2006) y coriorretinitis (Khairallah y cols., 2004). Aproximadamente una de cada 150 infecciones desarrolla un cuadro más agresivo por afectación del SNC, desarrollando encefalitis, meningitis o parálisis flácida aguda parecida a una poliomielitis (Sejvar y cols., 2003), en las que se pueden presentar desórdenes del movimiento, como temblores y parkinsonismo. La mayoría de casos mortales (entre el 4 % y el 15 % de los pacientes con enfermedad neurológica manifiesta) se producen en personas mayores de 50 años e inmunodeprimidos. Éstos presentan un mayor riesgo de desarrollar complicaciones neurológicas, bien por el retraso en la respuesta de anticuerpos, con el consiguiente aumento de la duración y los niveles de viremia, o bien por cambios estructurales o funcionales en el SNC que alterasen la barrera hematoencefálica facilitando la neuroinvasividad del virus (Marfin y Gubler, 2001). También se ha visto que, en personas

con diabetes, hipertensión, inmunodeprimidos y en las que abusan del alcohol, parecen tener un mayor riesgo de desarrollar una encefalitis (Diamond y cols., 2003, Bode y cols., 2006). Los pacientes con encefalitis o parálisis flácida que sobreviven tienen un mal pronóstico, y muchas veces desarrollan secuelas neurológicas permanentes (Petersen y Roehrig, 2001). El marcado neurotropismo que han demostrado las cepas de WNV responsables de los brotes registrados en la cuenca mediterránea durante la década de 1990, hace suponer que una posible circulación del virus en esta región, se traduciría en la aparición de casos de meningitis y encefalitis vírica que pudiesen quedar sin diagnóstico etiológico.

Los síntomas de infección en caballos y otros equinos domésticos, varían desde una enfermedad asintomática a una encefalitis mortal. Los síntomas clínicos más comunes están asociados con una lesión de la médula espinal y son ataxia (inestabilidad), incoordinación y debilidad de las patas, letargia (adormecimiento del cuerpo), temblores musculares, y, en alrededor del 10 % de los infectados, encefalitis o mielitis con un rango de mortalidad del 28 al 45 %. La viremia suele ser baja en adultos y moderada en individuos jóvenes (Castillo-Olivares y Wood, 2004).

En aves, la susceptibilidad a la enfermedad puede ser muy variable entre ellas, e incluso puede variar de un brote a otro, dependiendo de la propia virulencia del WNV. Las aves no suelen presentar síntomas clínicos, a excepción de los córvidos, gorriones y rapaces que son altamente susceptibles. Los síntomas comunes en la mayoría de las especies son la anorexia, deshidratación, debilidad, depresión, pérdida de peso y muerte. En la mayoría de las especies susceptibles se han descrito síntomas neurológicos, como ataxia, temblores, desorientación, dar vueltas en círculo y una postura anormal de la cabeza (Komar, 2003).

En roedores, el virus presenta una gran neurovirulencia y neuroinvasividad, siendo el ratón un buen modelo para el estudio de WNV ya que reproduce en muchos aspectos los síntomas y características de la enfermedad que se observan en humanos.

3.6 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la infección puede realizarse evidenciando la presencia del propio virus o de alguno de sus componentes (diagnóstico directo) o analizando la respuesta inmune a la infección (diagnóstico indirecto) (Zeller y Schuffenecker, 2004).

3.6.1 Diagnóstico directo

La viremia producida en humanos es baja y, aunque los ácidos nucleicos virales pueden llegar a ser detectados mediante técnicas de amplificación genómica, el virus raramente puede ser aislado a partir de una muestra sanguínea (Beasley, 2005). Por eso, la muestra ideal para el diagnóstico directo es el líquido cefalorraquídeo (LCR). El aislamiento en el laboratorio se suele realizar en niveles de bioseguridad de nivel 3, por inoculación intracerebral de la muestra en ratones lactantes, o por cultivo en líneas celulares de mosquito o de vertebrados susceptibles. Este aislamiento requiere de una confirmación posterior mediante amplificación genómica (RT-PCR), inmunofluorescencia o

neutralización con antisueros específicos. El diagnóstico molecular es rápido y capaz de detectar el virus en pequeñas cantidades, pero es preciso tener en cuenta la variabilidad genética del mismo al ser un virus de ARN. Las técnicas de detección de antígeno hasta ahora descritas no muestran sensibilidad suficiente como para poder ser utilizadas con fines diagnósticos.

En casos mortales el virus puede ser identificado y aislado de biopsias de cerebro, mediante técnicas de inmunohistoquímica y PCR en tejido cerebral. Se recomienda remitir al laboratorio especializado muestras de páncreas, hígado, bazo, corazón, pulmón y riñones para estudio convencional y específico. Las muestras del SNC deberían incluir médula y raíces nerviosas. La histología convencional demuestra cambios citopáticos compatibles con la infección por WNV en los órganos principalmente afectados (corazón y SNS), y las técnicas de biología molecular determinan la presencia del virus en la muestra.

3.6.2 Diagnóstico indirecto

La desaparición de la viremia coincide con la aparición de los síntomas de la enfermedad y de anticuerpos IgM neutralizantes, mientras que los anticuerpos IgG sólo comienzan a detectarse a la semana de aparecer los primeros síntomas de la enfermedad (Figura 10)(Sánchez-Seco y Navarro, 2005). En la fase aguda el diagnóstico puede realizarse por detección de anticuerpos específicos en suero o LCR por ELISA. Se considera diagnóstico confirmado el incremento significativo en los títulos de IgG entre sueros de la fase aguda y convaleciente. La presencia de IgM en LCR se asocia con replicación intratecal del virus. Los resultados IgG o IgM positivos se confirman por neutralización para evitar reactividad cruzada entre algunos flavivirus (Hayes y cols., 2005b).

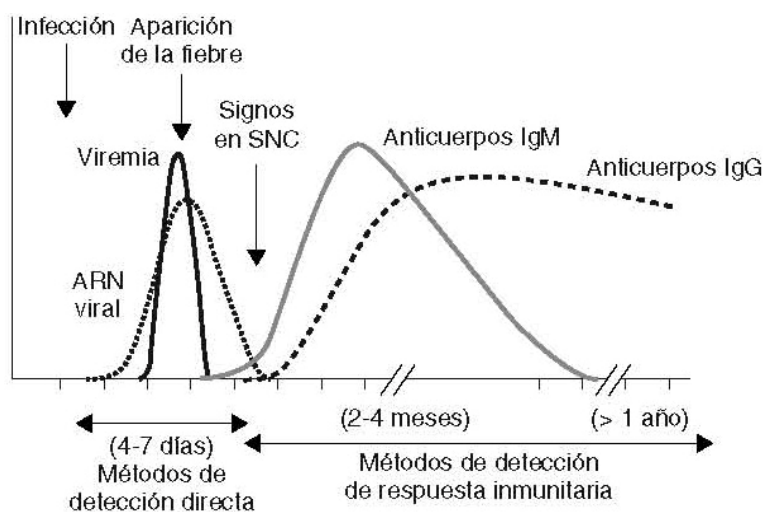


Figura 10. Cinética de aparición de la viremia y de la respuesta inmunitaria en las infecciones por WNV. Adaptado de Sánchez-Seco y Navarro, 2005.

3.7 Tratamiento

Hasta la fecha, no se ha encontrado un tratamiento específico, sólo sintomático y de soporte. Los casos leves con sintomatología gripal responden habitualmente a los antitérmicos y a medidas de soporte como el reposo domiciliario y la hidratación abundante. Los pacientes graves, que requieren ingreso hospitalario, frecuentemente necesitan soporte ventilatorio (encefalitis, polirradiculoneuritis)(Beasley, 2005, Hayes y cols., 2005b).

La respuesta inmune humoral y celular frente a proteínas virales es determinante en la protección frente a la infección viral y previene la diseminación del virus en el SNC, y en este campo se están invirtiendo los esfuerzos para ver si se consigue una terapia eficaz basada en el uso de anticuerpos específicos en humanos. Se ha visto que la producción de anticuerpos neutralizantes contra la proteína E del virus contribuye de modo significativo a conferir protección, aunque anticuerpos neutralizantes frente a otras proteínas como la prM también puede facilitarla. En paralelo, se ha postulado que la IgM tiene un papel crítico en el control de la infección durante las fases tempranas, limitando la propagación del virus (Mehlhop y Diamond, 2008).

Finalmente, también se está intentando desarrollar terapias antivirales, enfocadas esencialmente en la interrupción del ciclo replicativo del virus (Morrey y cols., 2002). Estudios recientes proponen el uso de ribavirina y al interferón IFN- α como agentes antivirales (Morrey y cols., 2004); sin embargo no hay estudios definitivos concluyentes y se están encontrando limitaciones en el tratamiento de infecciones graves al necesitar grandes dosis para que estos fármacos alcancen el SNC (Jordan y cols., 2000).

3.8 Vacunas

Existen actualmente cuatro vacunas para caballos y una para gansos, y aunque aún no ha sido aprobada ninguna para humanos, se han hecho progresos significativos (Kramer y cols., 2008).

Una de las estrategias seguidas ha sido la de desarrollar vacunas quiméricas, para ello se han reemplazado los genes prM y E de la cepa vacunal 17D del virus de la fiebre amarilla por los de WNV y en recientes pruebas realizadas en humanos, se ha podido comprobar que induce la producción de anticuerpos neutralizantes frente a WNV y una respuesta de células T específica (Monath y cols., 2006). De igual forma también se han construido virus quiméricos a partir de la combinación de genes de WNV con los del virus Dengue (WN/DEN4 y DEN2PDK-53/WN) y se ha visto que confieren protección frente al desafío con una dosis letal en ratones (Pletnev y cols., 2002, Huang y cols., 2005).

Otra aproximación ha sido la del diseño de vacunas inactivadas con formol o derivados, una de las propuestas que actualmente está siendo usada en veterinaria (en caballos y gansos) (Ng y cols., 2003, Samina y cols., 2005). Se ha trabajado también en la obtención de cepas atenuadas introduciendo mutaciones en genes no estructurales que resultan en una replicación viral reducida (Hall y cols., 2003, Yamshchikov y cols., 2004),

como en el gen de la cápsida que incapacita la liberación del virus de la célula (Mason y cols., 2006, Seregin y cols., 2006).

Por último, señalar que también se han realizado estudios con vacunas de subunidades recombinantes (Ledizet y cols., 2005, Lieberman y cols., 2007), en las que se inoculan las proteínas virales directamente en el hospedador; con vectores virales que expresan genes de WNV (Karaca y cols., 2005); y con vacunas de ADN (Davis y cols., 2001), donde las proteínas son producidas por la célula hospedadora tras la inoculación de la misma (de este tipo hay vacunas comercializadas para equinos).

3.9 Vigilancia y control de la enfermedad

La vigilancia de la infección por WNV se focaliza principalmente en sus vectores y en sus huéspedes. Generalmente se realiza una vigilancia activa de las aves para detectar posibles mortandades entre las poblaciones salvajes o seroconversiones en aves centinela; la detección de virus en mosquitos se considera una herramienta menos sensible para detectar la circulación del virus en una zona concreta. La vigilancia activa debe reforzarse con vigilancia pasiva tanto en animales de granja como en seres humanos. Las aves domésticas son especies centinelas en la vigilancia del virus, al desarrollar bajos niveles virémicos en la respuesta a la infección y al estar frecuentemente expuestas al vector. En el ámbito veterinario debe potenciarse la declaración de enfermedades neurológicas en animales, especialmente aves y caballos, estos últimos por ser especialmente susceptibles a manifestar signos de enfermedad neurológica. En humanos debería implementarse la declaración obligatoria de los casos de encefalitis y meningitis asépticas sin diagnóstico etiológico en zonas y épocas de riesgo (Vallès y Sánchez, 2000).

Una vez que se conoce la circulación del virus, es crítico desarrollar métodos efectivos para poder limitar su transmisión y poder prevenir la enfermedad (Gubler y cols., 2000). Actualmente, las medidas de control para detener la transmisión incluyen: evitar la exposición del hombre a mosquitos infectados y prevenir su picadura, a través del uso de ropa protectora y de repelentes; reducir las poblaciones de mosquitos (monitorización de las poblaciones y reducción de las mismas con larvicidas y adulticidas); proteger a los equinos con una vacunación masiva y en zonas endémicas realizar un diagnóstico en las donaciones de sangre y de órganos para asegurarse de no infectar al paciente receptor de la donación (Hayes y cols., 2005a).

Objetivos

Teniendo en cuenta la importancia de los flavivirus en salud humana, la gran actividad y expansión del virus West Nile en los últimos años y los antecedentes serológicos que evidencian la presencia de estos virus en nuestro país, esta tesis doctoral se ha basado en el estudio de la presencia de estos virus, en su caracterización molecular y filogenética y en el desarrollo de nueva metodología para su diagnóstico.

Por ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Llevar a cabo un estudio sobre la presencia y circulación del virus West Nile en posibles vectores capturados en humedales españoles, e identificar los flavivirus presentes en los humedales estudiados en nuestro país.
2. Caracterizar genómicamente los flavivirus detectados, y realizar una clasificación filogenética y un estudio evolutivo de los mismos.
3. Realizar una revisión de los diferentes genotipos del virus West Nile, que nos permita a su vez desarrollar un método de detección genómica, capaz de amplificar con eficacia todos los genotipos descritos hasta el momento.

Materiales y métodos

1 ESTUDIO EN CULÍCIDOS Y FLEBOTOMOS

1.1 Capturas: áreas geográficas y trampas de captura

El muestreo se llevó a cabo por los Servicios de Control de Mosquitos de cuatro humedales españoles que cubren las Marismas del Odiel y la Estación Biológica de Doñana (Huelva), el Baix Llobregat en Barcelona, la Bahía de Rosas y Aiguamolls del Ampurdá en Gerona y el delta del Ebro en Tarragona (Figura 11). Las capturas se realizaron principalmente durante los meses de Mayo a Octubre, los meses de mayor abundancia y actividad de los vectores y entre los años 2001 y 2005 en los humedales catalanes y entre el 2002 y el 2006 en los humedales andaluces.



Figura 11: Humedales muestreados para culicidos y flebotomos.

La hematofagia de los imagos hembras hace que sean éstas el objetivo de los estudios sobre capacidad vectorial. Por tanto el muestreo se diseñó para capturar preferentemente esta fase del desarrollo. Las trampas se colocaron al atardecer y se

recogieron al día siguiente al amanecer, ya que ese es el periodo de máxima actividad de la mayoría de los culícidos y flebotomos. Las trampas empleadas fueron de tres tipos (Figura 12):

- De luz y CO₂ (CDC) - Esta trampa CDC (*Center for Disease Control*) es de luz incandescente, suplementada con CO₂ como atrayente generado a partir de hielo seco. Ha demostrado ser muy eficiente en la captura de una gran diversidad de especies de culícidos y flebotomos, con un alto número de individuos capturados y además permite obtener los insectos vivos.
- Gravid-traps - Son trampas diseñadas para capturar hembras grávidas (a punto de realizar la puesta de los huevos). Han demostrado ser menos eficaces que las trampas CDC en cuanto al número de ejemplares y especies capturadas, pero la frecuencia de culícidos portadores de virus encontrados, es proporcionalmente más alta, debido a que la mayor parte de las hembras capturadas se han alimentado previamente sobre potenciales hospedadores de virus. Consiste en un barreño con agua estancada y un ventilador que succiona a los insectos, que quedan atrapados a una redcilla.
- Cebo humano - Consiste en utilizar el brazo humano como cebo para atraer a los insectos y una vez que se posan en el mismo, aspirar con una cánula hasta llevarlos a una pequeña bolsa donde se van almacenando.



Figura 12: Trampas utilizadas en las capturas de los insectos. En la figura se muestran las trampas CDC (izquierda) y Gravid-trap (derecha).

1.2 Clasificación y elaboración de los lotes

Una vez capturados, los insectos se transportaron al laboratorio, donde se observaron al microscopio para su correcta clasificación, teniendo en cuenta las características morfológicas diferenciales de los individuos adultos. Los individuos capturados se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante diez minutos, para matarlos lo antes posible e

impedir posibles alteraciones de la muestra que pudiesen interferir en su correcta identificación. En paralelo a la clasificación, se procedió a la elaboración de los lotes de hasta 100 individuos, en los que se anotaron la especie, zona geográfica y fecha de captura, número de individuos, número de hembras y si estaban o no alimentadas. A estos lotes se les añadió de 200 (hasta 50 individuos) a 400 μ l (de 50 a 100 individuos) de un tampón de lisis comercial (AVL, Qiagen), que inactiva y mantiene el ARN viral, y 100 μ l de agua libre de ARNasas, tras lo cual se homogeneizó la muestra con un palillo de madera hasta que las estructuras de los insectos hubiesen desaparecido. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

Para poder realizar un aislamiento viral de las muestras con resultado positivo tras la RT-Nested-PCR, en los humedales de Huelva a partir de Noviembre del año 2005, la recogida de la muestra comenzó a realizarse en Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM, Sigma) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Biological industries) al 10 %, una mezcla de antibióticos (Penicilina 0,5 mg/ml y Estreptomina 0,5 mg/ml, Biowhitaker) al 0,5 % y con L-Glutamina (Biowhitaker) al 1 %. En tubos de tapón de rosca de 1,5 ml se añadieron 500 μ l del medio de transporte (para lotes de 1 a 30 mosquitos) ó 700 μ l (para lotes de 30 a 50 mosquitos). Se trituraron los mosquitos con los palillos y la mezcla se agitó con la ayuda de un vórtex durante 1 minuto, para su correcta homogeneización. A continuación se centrifugó a 13.000 revoluciones por minuto (rpm) en microcentrífuga durante 5 minutos y se añadieron 140 μ l del sobrenadante a un tubo estéril que contenía 560 μ l de AVL, para realizar la extracción del ARN viral con el que realizar el diagnóstico molecular. El sobrenadante que quedó en el tubo con medio de transporte, se congeló a -80 °C (o nitrógeno líquido) hasta su inoculación en cultivos celulares en el caso de que se evidenciara la presencia de genoma viral tras amplificación genómica.

2 EXTRACCIÓN DEL ARN VIRAL

Para llevar a cabo la extracción se utilizó el equipo comercial QIAamp Viral RNA (Qiagen, Izasa, España), siguiendo las recomendaciones del fabricante, que fueron las siguientes:

Continuando el proceso del apartado 1.2, cada muestra almacenada a -80 °C en AVL fue descongelada, se la sometió a agitación con un vórtex durante 3 a 5 segundos y se la centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm para limpiarla de restos celulares. Se tomaron 250 μ l del sobrenadante de la muestra, que se añadieron a un tubo estéril que contenía 200 μ l de etanol absoluto, se agitó volteando el tubo de arriba a abajo y se dio un pulso de centrifugación. Posteriormente se transfirió la muestra a una columna QIAamp (para la unión del ARN) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto en una microcentrífuga a 4 °C. Todas las centrifugaciones a partir de aquí se realizaron a una temperatura de 22 °C. Se eliminó el filtrado y se realizaron dos lavados consecutivos con 500 μ l de los tampones AW1 y AW2 respectivamente, añadiendo el tampón a la columna y centrifugando en cada paso a 13.000 rpm durante 1 minuto en el primero y 5 minutos en el segundo. Para secar la membrana y eliminar restos de etanol, se retiró nuevamente el filtrado y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos. Finalmente los ácidos nucleicos se eluyeron en 60 μ l de tampón AVE (agua libre de ARNasas), que se añadió a la columna y

se incubó durante 2 minutos antes de centrifugar el tubo a 13.000 rpm durante 2 minutos. El eluido obtenido, que contenía el ARN extraído de la muestra, se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización.

3 AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.1 Técnica de RT-Nested-PCR genérica para detección de flavivirus

Para la detección del genoma viral en los vectores, se utilizó una reacción en cadena de la polimerasa anidada, tras retrotranscripción de la muestra (RT-Nested-PCR), utilizando cebadores degenerados (Tabla 7), diseñados para amplificar el genoma de cualquier flavivirus presente en las muestras (Sánchez-Seco, 2005). Tanto la preparación de las mezclas de amplificación, como la extracción de los ácidos nucleicos, como la visualización de los productos de amplificación, se llevaron a cabo en espacios separados físicamente para evitar contaminaciones de las mismas.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño esperado del fragmento
FLAVI1+	GAYYTIGGITGYGGIIGGIRGITGG	1035pb
FLAVI1-	TCCCAICCGCIRTRTCRTCIGC	
FLAVI2+	YGYRTIYAYAWCAYSATGGG	143pb
FLAVI2-	CCARTGITCYKYRTTIAIRAAICC	

Tabla 7. Cebadores utilizados en la RT-Nested-PCR genérica de flavivirus. El número 1 indica la RT-PCR y el 2 la Nested-PCR. El signo “+” corresponde al sentido genómico y el “-” al antígeno de los cebadores.

La zona elegida fue una porción del gen de la polimerasa viral (NS5) de los flavivirus, al ser una de las zonas más conservadas, y permitió el diseño de una PCR genérica. Consiste en una primera reacción de RT-PCR en la cual el ARN viral se transforma en ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa y posteriormente se amplifica el ADNc por PCR. El producto de amplificación de la primera PCR se usa como molde en una segunda reacción de amplificación, en la que los cebadores empleados se unen a una región interna del producto de la primera amplificación. Con esto se aumenta la especificidad y sensibilidad de la técnica. El control positivo empleado en todas las reacciones de amplificación, fue 10 veces la dilución más alta de la que se obtenía amplificación (dilución límite) de un extracto de WNV (cepa Eg101) de título conocido. Como control negativo se usó agua destilada. Para todos los procesos de amplificación se utilizaron termocicladores Peltier Thermal Cycler PCT-200 (MJ Research, Watertown, MA, USA) y tubos de reacción de 0,2 ml de pared delgada (REAL, Durviz, Valencia, España). El fragmento final amplificado esperado tiene un tamaño de 143 pb para cualquier flavivirus (Figura 13).

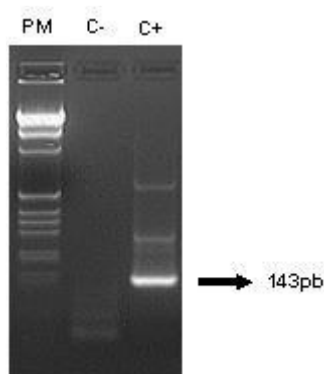


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio de los productos de amplificación de la RT-Nested PCR de detección para flavivirus. Marcador de peso molecular de 1 Kb (PM), control negativo (C-) y control positivo (C+).

3.2 Reacción de Nested-PCR específica para West Nile

Para poder descartar rápidamente que los productos amplificados con la técnica anterior se correspondiesen a WNV, se diseñó una Nested-PCR que nos permitiese a partir del producto de la primera amplificación de la técnica anterior, llevar a cabo una segunda amplificación específica sólo para WNV. Para ello se diseñaron unos cebadores específicos que no amplificaran el resto de los flavivirus (Tabla 8). El resultado fue una primera amplificación genérica para flavivirus seguida de una específica para WNV.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño esperado del fragmento	Posición en el genoma AF196835
WNN2+	AARCCYCTNCTYAAAYTCWGAYAC	318pb	8485-8507
WNN2-	TCRTTSARNACNWRYTTIRCWCC		8791-8813

Tabla 8. Cebadores utilizados en la Nested-PCR específica de WNV. El signo “+” corresponde al sentido genómico y el “-” al antígenómico de los cebadores.

Para llevar a cabo esta PCR anidada, se añade 1 µl del producto amplificado de la primera reacción que sirve de molde, en un tubo de reacción que contiene 49 µl de una mezcla de reactivos constituida por 4 mM de MgCl₂ (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT), 0,1 mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia), 80 pmol de los cebadores WNN2+ y WNN2- y 2,5 unidades de AmpliTaq DNA Polimerasa (Perkin Elmer-Cetus). El programa del termociclador en esta reacción comienza con una desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94 °C durante 30 segundos (amplificación), 45 °C durante 3 minutos (unión de los cebadores) y 72 °C durante 30 segundos (elongación), con una extensión final de 72 °C durante 5 minutos. El fragmento final amplificado tiene un tamaño de 318 pb (Figura 14).

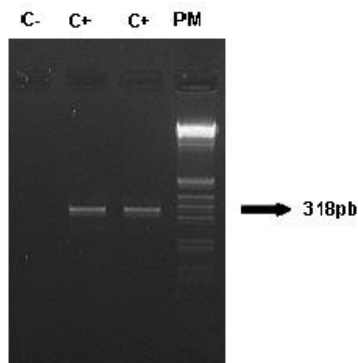


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio de los productos de amplificación de la Nested-PCR de WNV. Marcador de peso molecular 1 Kb (PM), control negativo (C-) y 2 diluciones límites de WNV como controles positivos (C+).

4 ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1 Visualización de los productos de amplificación

La visualización de los productos resultantes de la amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Para ello se prepararon geles de agarosa (MS8, Hispanlab, España) al 2 %, en tampón tris-borato-EDTA (TBE), teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. De cada muestra se cargaron 10 μl en los geles tras añadirla un tampón de carga que contenía un 30 % de glicerol en agua, 0,25 % de azul de bromofenol y 0,25 % de xileno-cianol. El marcador de peso molecular empleado fue un patrón de ADN comercial de 1Kb (Invitrogen) a una concentración de 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$. La electroforesis se desarrolló en TBE a una intensidad de corriente eléctrica de 100 voltios durante aproximadamente 30 minutos, visualizándose los productos de amplificación bajo luz UV.

4.2 Purificación de ácidos nucleicos

Los productos de amplificación detectados en el gel de agarosa y con un tamaño similar al esperado, fueron purificados para su posterior secuenciación e identificación. Este proceso se realizó con dos técnicas diferentes:

- Si en el gel se observaba una **única banda y del tamaño esperado**, la purificación se hizo con el equipo QIAquick PCR Purification (Qiagen). La muestra se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml con 200 μl de tampón PB, se mezcló y se añadió a una columna de purificación. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Tras eliminar el eluido, se lavó la columna con 750 μl de tampón PE, centrifugando a 13.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Para secar la columna se realizó otra centrifugación a la misma

velocidad y la misma duración. La columna se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se le añadieron 30 µl de agua destilada, y tras dejar que la columna se empapase durante 1 minuto, se centrifugó durante otro minuto a 13.000 rpm para la obtención del purificado, el cual se conservó a – 20 °C hasta su secuenciación.

- Si en el gel de agarosa se observaban **varias bandas de diferentes tamaños**, el producto de amplificación se volvió a visualizar en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) en las mismas condiciones que en el paso 4.1. La banda del tamaño esperada se cortó del gel con un bisturí y se purificó con el equipo QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Se pesó el tubo eppendorf que contenía la agarosa cortada y se le añadieron 300 µl de tampón QC por cada mg de agarosa. A continuación se realizó una incubación a 50 °C en un termobloque durante 10 minutos, hasta la total disolución de la agarosa. Seguidamente se añadieron 100 µl de isopropanol frío por cada mg de agarosa. La mezcla resultante se hizo pasar por una columna de purificación centrifugando a 13.000 rpm durante 1 minuto y a temperatura ambiente. Se eliminó el eluido y se lavó la columna con 750 µl de tampón PE, centrifugando a 13.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Para secar la columna se realizó otra centrifugación a la misma velocidad y con la misma duración. La columna se colocó entonces en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se le añadieron 30 µl de agua destilada, tras 1 minuto de incubación se centrifugó durante 1 minuto y a 13.000 rpm para la obtención del purificado, que se conservó a – 20 °C hasta su secuenciación.

4.3 Secuenciación de ácidos nucleicos

Los genomas amplificados se secuenciaron utilizando el equipo ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems). Cada muestra se secuenció por duplicado tanto en sentido directo como inverso. En total se prepararon cuatro tubos por muestra, cada uno contenía 2 µl de Terminador Ready Reaction Mix, 1,2 µl de cebador a una concentración inicial de 40 pmol, de 2 a 4 µl de DNA molde y agua destilada hasta llegar a un volumen total de 10 µl. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en termocicladores con un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos y posteriormente, se realizaron 25 ciclos de 96 °C durante 10 segundos (desnaturalización), 50 °C o 60 °C (dependiendo de la temperatura óptima del primer para su unión al ADN) durante 5 segundos (hibridación) y 60 °C durante 4 minutos (elongación). El resultado de la secuenciación se analizó en el secuenciador automático ABI PRISM 377 DNA Analyser (Applied Biosystems).

5 ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

5.1 Obtención de la secuencia consenso

El análisis de las secuencias de nucleótidos obtenidas se realizó utilizando el paquete informático DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, Wiscconsin, USA), que permite el análisis de las secuencias hasta llegar a una secuencia consenso utilizando las obtenidas para cada muestra en la secuenciación. Para su realización se usaron fundamentalmente los programas EditSeq y SeqMan. Una vez obtenida la secuencia consenso se hizo una primera identificación de la misma comparándola con las secuencias encontradas en la base de datos del banco de genes del NCBI (del inglés *Nacional Center for Biotechnology Information*) y el empleo del programa en red BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5.2 Alineamientos de las secuencias consenso

La identificación del agente detectado se llevó a cabo mediante estudios de homología de secuencias, realizando alineamientos múltiples de las secuencias obtenidas y de todas aquellas relacionadas y pertenecientes al mismo género, utilizando para ello los programas ClustalX versión 1.8 (Thompson y cols., 1997) que está incluido en el programa MEGA versión 3.1 (Kumar y cols., 2004). El programa MACAW 32 (Schuler y cols., 1991) se usó para confirmar la idoneidad de los alineamientos previamente obtenidos.

5.3 Análisis filogenético

Para llevar a cabo todo este análisis, se incluyeron todas las secuencias disponibles en las bases de datos, las cuales se nombraron según las recomendaciones del ICTV (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/ICTVindex.htm> -Comité Internacional en Taxonomía de Virus). Se utilizó el programa MEGA 3.1 para realizar el estudio filogenético y el análisis se hizo tanto a nivel de nucleótidos como en su traducción a aminoácidos. Se compararon los resultados, empleando en el análisis filogenético diferentes métodos y modelos, como los métodos Neighbor-Joining, Minimum Evolution, Maximum Parsimony, UPGMA y modelos distancia-p, Kimura-2, Jukes-Cantor, Tajima-Nei, Tamura-Nei. En la mayoría de los casos, el mejor árbol fue el generado al utilizar el análisis Neighbor-Joining como método de obtención del árbol, el algoritmo Kimura-2 como parámetro para calcular la distancia de nucleótidos y aminoácidos y un valor de certidumbre (o "*bootstrap*" como robustez de la topología del árbol) con un valor de 1000 réplicas como test estadístico de validación.

6 ANÁLISIS GENÓMICO DE LOS VIRUS DETECTADOS

6.1 Desarrollo de una RT-Nested-PCR genérica en el gen NS5 para estudios de filogenia

Para obtener una mayor información genética de los virus amplificados y poder realizar un estudio filogenético más completo, se diseñó una RT-Nested-PCR genérica para flavivirus en el gen NS5 teniendo en cuenta que el fragmento obtenido solapase con el que ya se tenía de la técnica descrita en el apartado 3.1 y que cubriese gran parte del gen. La elección de esta región obedece a su alto grado de conservación en todos los flavivirus, minimizándose así el riesgo de perder muestras positivas ante una posible mutación del virus en la zona de unión de los cebadores (Figura 15). Por otro lado, se trata de una zona en la que se han realizado numerosos estudios de filogenia previos y para la cual se conocen las secuencias de todos los flavivirus previamente descritos. Para elegir los cebadores se hicieron varios alineamientos de todas las secuencias depositadas en el NCBI, agrupándolas según la naturaleza del vector de transmisión del virus (mosquitos, garrapata o vector desconocido) usando para ello el programa MACAW 32.

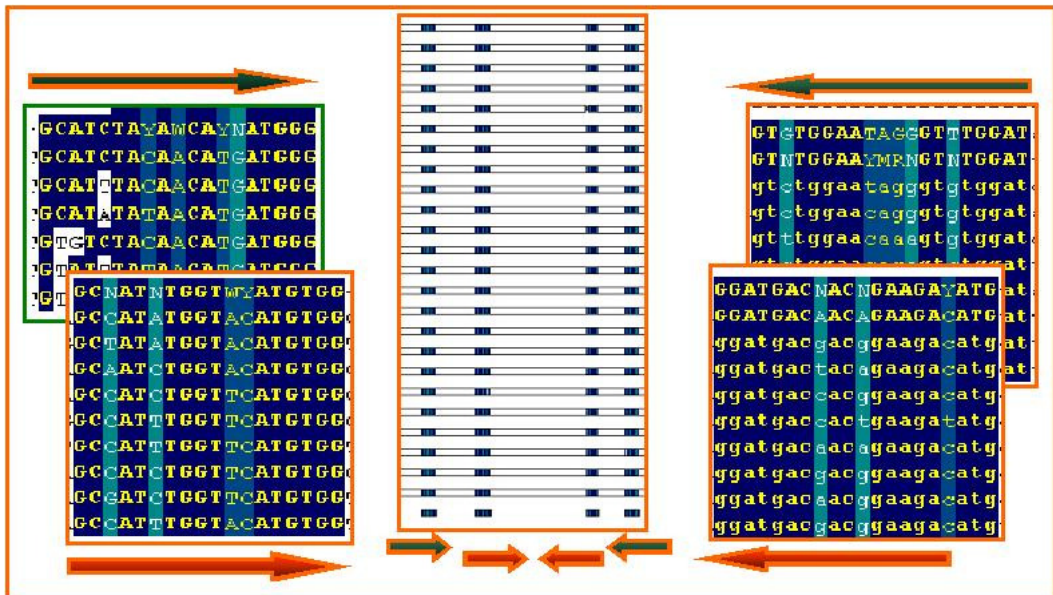


Figura 15. Cebadores seleccionados para la amplificación del fragmento del gen NS5. En verde se muestran los cebadores de la primera amplificación y en rojo los de la PCR anidada.

Para llevar a cabo la RT-PCR se utilizó el equipo *One Step®* (Qiagen). Cada tubo de reacción contenía 45 μ l de la mezcla compuesta por 2,5 mM $MgCl_2$, 0,4 mM de cada dNTP, 60 pmol de cada cebador 1NS5F y 1NS5Re y una combinación optimizada de dos enzimas transcriptasas reversas (Omniscrypt y Sensiscript) y de la enzima Hotstar Taq ADN polimerasa. A estos tubos se les añadió 5 μ l del extracto de ácidos nucleicos. A

continuación se introdujeron todos los tubos en el termociclador en un programa con un ciclo inicial de retrotranscripción a 50 °C durante 45 minutos, seguido de una desnaturalización y activación de la ADN polimerasa a 94 °C durante 15 minutos. Posteriormente se realizaron 40 ciclos de amplificación de 94 °C durante 1 minuto, 54 °C durante 4 minutos y 72 °C durante 1 minuto y 15 segundos. El programa finalizó con una elongación final de 72 °C durante 5 minutos.

Para la PCR anidada se añadió 1 µl del producto amplificado de la primera reacción a un tubo que contenía 49 µl de la mezcla de reactivos constituida por 5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,6 pmol de los cebadores NS52+ y NS52- y 2,5 unidades de AmpliTaq DNA Polimerasa. El programa del termociclador en esta reacción comenzó con una desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación de 94 °C durante 1 minuto, 3 minutos a 50 °C y 72 °C durante 1 minutos y 15 segundos, con una extensión final de 72 °C durante 5 minutos. Para llevar a cabo una buena secuenciación del producto se diseñaron cebadores internos situados en el fragmento amplificado (Tabla 9). El fragmento final amplificado tiene un tamaño de 1010 pb (Figura 16).

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño esperado del fragmento	Posición en el genoma AF196835
NS51+	GCATCTAYAWCAYNATGGG	1111pb	9035-9053
NS51-	CCANACNYNRTTCCANAC		10129-10146
NS52+	GCNATNTGGTWYATGTGG	1010pb	9103-9120
NS52-	CATRTCTTCNGTNGTCATCC		10103-10122
secNS5F	GACCARCGMGGWWSIGG	Cebadores internos para	9478-9494
secNS5Re	ACITAYSCNCTNAACACAG	secuenciar	9505-9523

Tabla 9. Cebadores utilizados en la RT-Nested-PCR genérica en el gen NS5 para filogenia y en la secuenciación del producto amplificado. El número 1 indica la RT-PCR y el 2 la PCR anidada. El signo “+” corresponde al sentido genómico y el “-” al antígeno de los cebadores.

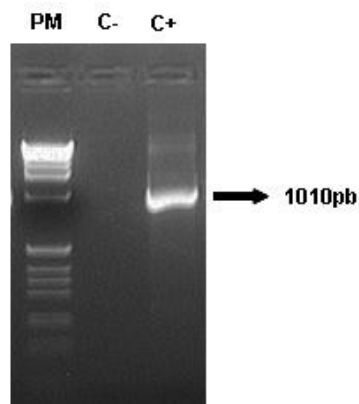


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio de los productos de amplificación de la RT-Nested-PCR genérica para filogenia en el gen NS5. Marcador de peso molecular (PM), control negativo (C-) y control positivo (C+).

6.2 Validación de la técnica

Se utilizó como molde genoma del virus West Nile (cepa Eg101) para la puesta a punto de la técnica. Para ello se hicieron variaciones en diferentes parámetros, como la concentración de dNTPs o de los cebadores, las temperaturas de hibridación de los cebadores y de la elongación. Una vez optimizada, se estudió la sensibilidad haciendo diluciones seriadas a partir de un *stock* viral de WNV previamente titulado, y se llega a detectar 0,1TDCI50/reacción (Figura 17). La técnica se validó con la amplificación de todos los flavivirus de los que se disponía en el laboratorio (Figura 18). Por otra parte se comprobó su utilidad potencial para amplificar directamente de muestras clínicas (sueros) de pacientes con sospecha de dengue (n=30)(Figura 19), cuyos resultados se corroboraron con la secuenciación del fragmento amplificado y con la RT-Nested-PCR específica para DENV disponible en el laboratorio (Domingo y cols., 2004).

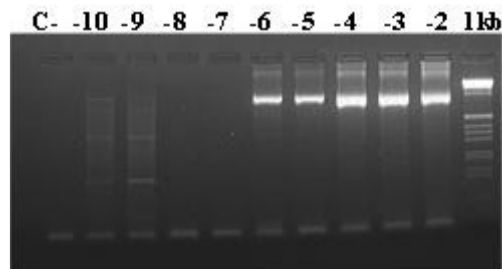


Figura 17. Sensibilidad de la RT-Nested-PCR diseñada en el gen NS5 para estudios de filogenia. Las diluciones virales se corresponden a la cepa Eg101 de WNV y el C- es agua destilada.

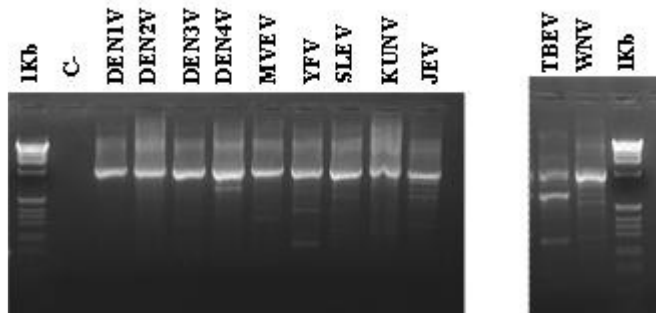


Figura 18. Validación de la RT-Nested-PCR para filogenia con diferentes flavivirus de importancia sanitaria para el hombre. En todos los casos se obtiene una banda del tamaño esperado que se confirmó por secuenciación.

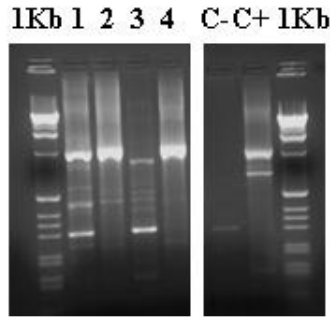


Figura 19. Validación de la RT-Nested-PCR para filogenia con muestras clínicas. La muestra 1 correspondía a un DV3, la 2 y 4 a un DV1 y la muestra 3 era negativa.

6.3 Análisis filogenético

Con las secuencias finales obtenidas de 1040pb aproximadamente, se realizó un estudio filogenético y evolutivo más en profundidad. Se empleó el programa ModelTest 3.7 (Posada, 2006) para elegir el mejor modelo de sustitución de nucleótidos y con el programa PAUP 4.0b10 (Posada, 2003) se realizó un análisis de máxima probabilidad (*Maximum Likelihood*, ML) con los parámetros elegidos por el ModelTest. Además estos resultados se compararon con un análisis filogenético utilizando el programa Phylip 3.67, el cual realizó también un análisis de ML aportándonos además valores de certidumbre, realizando el análisis en nucleótidos con el modelo Dayhoff PAM, con 100 repeticiones y definiendo una secuencia como raíz. Tras una comparación de la topología de los árboles obtenidos con ambas herramientas filogenéticas, se eligió el más reproducible y que se ajustaba mejor a los resultados esperados.

7 PRUEBA DE LA RIBONUCLEASA

Debido a la descripción de secuencias de flavivirus integradas en el genoma de los mosquitos (Crochu y cols., 2004), se realizaron pruebas para determinar si la naturaleza de las secuencias detectadas en los culícidos y flebotomos españoles, se correspondían a ADN o ARN. Para ello, se realizó en muestras representativas de cada grupo, una degradación del ARN con ribonucleasa y una posterior amplificación de los ácidos nucleicos.

Se utilizó una RT-Nested-PCR múltiple, para la detección de flavi y flebovirus (Sánchez-Seco et al., en preparación), eliminando el paso de RT al no añadir la retrotranscriptasa a las tubos de reacción Arbo1 (contienen la mezcla de reacción junto con las dos parejas de cebadores degenerados para amplificar tanto flavi como flebovirus) y al eliminar las incubaciones necesarias para la retrotranscripción. El control interno (CI) de la reacción fue un plásmido (ADN) con 1000 copias del virus Toscana (flebovirus). El primer paso consistió en añadir en un tubo 5 μ l del ARN con 1 μ l del CI e incubarlo durante 5

minutos a 95 °C para degradar el ARN. A continuación se añadió al tubo 2 µl de RNAsa A de páncreas bovino (Invitrogen) a una concentración de 0,01 mg/ml y se incubó en el termociclador durante 2 horas a 37 °C. Tras este paso se añadieron 5 µl de la muestra tratada con la enzima a tubos Arbo1, que se incubaron en el termociclador con un programa optimizado para la amplificación múltiple consistente en 95 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C 30 segundos, 50 °C durante 4 minutos y 72 °C durante 30 segundos, seguido de una elongación final de 72 °C durante 5 minutos. Una vez acabado este paso, 1 µl de los productos de amplificación se añadieron a tubos Arbo2 (contienen la mezcla de reacción junto con las dos parejas de cebadores degenerados de la segunda reacción) para llevar a cabo una PCR anidada.

En paralelo a esta degradación, 5 µl del ARN original de la muestra se ensaya, sin paso previo de degradación, con la técnica descrita en el apartado 3.1, con el objetivo de comprobar que el ácido nucleico de la muestra se ha mantenido en buenas condiciones, ya que se obtiene amplificación positiva. En ambos ensayos se utilizan controles positivos de amplificación, que consisten en dos diluciones límites de una mezcla de WNV y Toscana (Figura 20).

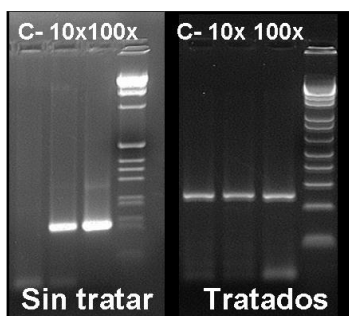


Figura 20. Validación de la prueba de la ribonucleasa con controles positivos de ARN. A la izquierda se muestra la imagen de los tubos sin tratar en los se observa la banda correspondiente a la amplificación en la PCR para flavivirus. En la parte de la derecha se muestra la imagen de los tubos tras el tratamiento y amplificación con la PCR múltiple, en los que la banda correspondiente a flavivirus de los controles positivos de ARN ha desaparecido y se ve la banda correspondiente al CI.

8 ANÁLISIS GENÓMICO DE UNA CEPA DEL VIRUS KUNJIN (KJ502/66)

8.1 Secuenciación del genoma completo

La cepa KJ502/66 fue cedida por el Dr. Hervé Zeller (Instituto Pasteur, Lyon, Francia). Con el fin de analizar los diferentes genotipos de WNV, se diseñó una estrategia para amplificar la secuencia total del virus. Para ello se realizó un alineamiento de aminoácidos de todas las secuencias disponibles de WNV disponibles en las bases de datos, agrupados en cinco diferentes genotipos o linajes. Se escogió una secuencia como representante de cada grupo y se introdujeron en el programa Hint-PCR (Dopazo y Sobrino, 1992). Con este programa se buscaron parejas de cebadores óptimas para amplificar todo el genoma de los diferentes virus. Se consiguió un total de 897 cebadores, y se eligieron las parejas teniendo en cuenta el tamaño y ubicación de los fragmentos que se iban a amplificar, eligiéndose aquellos que produjeran amplificaciones de entre 400 y 1.000 nucleótidos, y se fue comprobando en el programa Oligo6 (Molecular Biology Insights), que los cebadores propuestos eran compatibles entre ellos tras hacer las degeneraciones correspondientes.

Finalmente se eligieron 44 cebadores en diferentes combinaciones de los mismos para obtener fragmentos solapantes (Tabla 10). En los casos en los que no se pudo obtener amplificado, se volvieron a diseñar cebadores sobre la secuencia del virus KJ502/66 previamente amplificada.

Para llevar a cabo las amplificaciones del virus, se realizaron rondas únicas de amplificación, ya que la muestra de partida era el sobrenadante de un cultivo celular del virus, en el que la carga viral es muy alta. Las condiciones utilizadas en cada reacción de amplificación fueron las mismas que las utilizadas en el apartado 6.1, a excepción de la concentración inicial de los cebadores, que en este caso fue de 50 pmol. La programación del termociclador fue la siguiente: un ciclo inicial de retrotranscripción a 50 °C durante 45 minutos, seguido de una desnaturalización y activación de la ADN polimerasa a 94 °C durante 15 minutos. Posteriormente se realizaron 40 ciclos de amplificación de 94 °C durante 30 segundos, con una temperatura de hibridación de los cebadores variable (óptima para cada pareja de cebadores utilizados) durante 1 minuto y una elongación a 72 °C durante 1 minuto. Por último se dio un paso final de 72 °C de 5 minutos.

CEBADORES	SECUENCIAS	POSICIÓN EN EL GENOMA AF196835	Tm cebador
KJ1+	5' CTTAGTAGTGTTTGTGAGG 3'	28-46	54°C
KJ1-	5' AATCCCACRTCAYATNGC 3'	577-593	51°C
KJ2+N	5' GGTGTCAACAAACAAACAGC 3'	307-326	52°C
KJ2-N	5' GCACAAAATGGCNACNTC 3'	1378-1396	54°C
KJ3+	5' TGCTTGGGTATGAGYACAG 3'	973-992	59°C
KJ3-	5' TCCTCATTGTGTGCYTCNCC 3'	1198-1217	60°C
KJ4+	5' GATTGTGAACCCCGRTCAGG 3'	1531-1550	63°C
KJ4-	5' CGTGAGTTGATNCCCATCC 3'	2378-2396	59°C
KJ5+	5' TTCCCACACTTCAGTNGCTTC 3'	1979-2000	65°C
KJ5-	5' CACTTCCAARCTRITCC 3'	2918-2934	57°C
KJ6+	5' GGTGTTTATACACAAYG 3'	2523-2539	47°C
KJ6-	5' CGTATCTCCATCCCATACC 3'	3458-3476	50°C
KJ7+	5' CGTAAAAACAACWTGGC 3'	3030-3047	51°C
KJ7-	5' CCCTTAGTATCATCCAMGC 3'	3940-3958	57°C
KJ8+	5' GCTGACATGATTGATCCTTTTC 3'	3532-3553	62°C
KJ8-	5' GTTCCGTCATCATCMAG 3'	4453-4470	53°C
KJ9+	5' TGCGCGTAGCNTGGATG 3'	3932-3948	65°C
KJ9-	5' GGGGCTTAAACACNCC 3'	4951-4967	53°C
KJ10+N	5' CAATACACAAANAGAGG 3'	4597-4613	47°C
KJ10-N	5' GTATCCNGANTTCCANGC 3'	5641-5658	55°C
KJ11+	5' CAGAAGGAGAAATNNGGGGC 3'	4967-4985	59°C
KJ11-	5' GTAAGTGGGTCATC 3'	5464-5480	52°C
KJ12+	5' CTATTTGTGATGGATGARG 3'	5452-5470	54°C
KJ12-	5' CGACATACATNGTGTC 3'	6541-6556	50°C
KJ13+N	5' GAAGACAACAATGAAGTGG 3'	6334-6352	54°C
KJ13-	5' GATACCGCNTACAGNGACC 3'	7040-7058	60°C
KJ14+	5' GACACCATGTATGTNGTRGC 3'	6541-6560	57°C
KJ15-	5' AACTGGCTCCRTTCTCC3'	6684-6700	54°C
KJ15+N	5' TGGAAATCATGAAGAACCG 3'	7021-7037	52°C
KJ15-	5' AACTGGCTCCRTTCTCC3'	7545-7561	54°C
KJ16+	5' GTCACATTGTGGGAGAAAYGG 3'	7535-7553	61°C
KJ16-N	5' GCCGATTCTCCRATRTCAC 3'	8114-8132	58°C
KJ17+	5' CATAGTGACCATGAAGAG 3'	8046-8063	52°C
KJ17-	5' GTGACGTTTGTNATNGTG 3'	8685-8702	52°C
KJ18+	5' GAATACAGCTCCACNTGGC 3'	8545-8563	57°C
KJ18-	5' CTCAACACCNCCTCC 3'	9196-9215	52°C
KJ19+	5' CATTTACAACATGATGGG 3'	9036-9053	50°C
KJ19-	5' CAAAAGGGGACCTGCTGCC 3'	9803-9821	60°C
KJ20+	5' GCAAGTTGTGACYTACGC 3'	9495-9512	55°C
KJ20-	5' CGATTAGACTKCCRCAC 3'	10233-10249	52°C
KJ21+	5' GAAAATGAATGGATGGAAGAC 3'	10153-10173	58°C
KJ21-	5' CTCCTTAACCTTAGTCC 3'	10800-10818	58°C
KJ22+	5' GGGGAAGGACTAGAGGTTAGAG 3'	10868-10889	62°C
KJNC-	5' AGATCCTGTGTTCTCGCAC 3'	11011-11029	58°C

Tabla 10. Cebadores utilizados para la amplificación del genoma completo de KUNV. Con la letra "N" se señalan los cebadores elegidos en la segunda fase del diseño. Con el signo "+" se señalan los cebadores en sentido genómico y el "-" en sentido antígenómico.

8.2 Análisis filogenético

Se utilizó el programa Modeltest con el fin de elegir el mejor modelo para realizar el estudio filogenético y el programa MEGA 3.1 para realizar el árbol. Este análisis se hizo tanto a nivel de nucleótidos como en su traducción a aminoácidos. Además se buscaron datos importantes como organización genómica, homologías genéticas entre los diferentes linajes y aislados, marcadores moleculares de virulencia y sitios de glicosilación

o motivos enzimáticos de reconocimiento para el corte de la poliproteína por enzimas proteolíticas y distancias genéticas.

9 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Los diferentes plásmidos recombinantes se utilizaron para la secuenciación de los clones obtenidos o para obtener un molde con secuencia conocida y cuantificable para ser usado en la optimización de algunas técnicas y/o como control interno de amplificación (ver apartado 10).

A continuación se describen las tres fases utilizadas para la construcción de los plásmidos recombinantes:

9.1 Clonación de los productos amplificados

Se utilizó el equipo comercial de clonación TOPOTA Cloning® (Invitrogen). La técnica consiste en la inserción del producto amplificado (previamente purificado) en el vector (TopoTA) en la siguiente reacción:

Reactivo	Volumen
Agua estéril	2-0 μ l
Solución salina (favorece la unión)	1 μ l
Producto PCR	2-4 μ l
Vector	1 μ l

El volumen obtenido, tras mezclarse bien, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos para lograr la ligación esperada.

9.2 Transformación en bacterias

Los productos de ligación se transformaron en bacterias competentes para obtener una mayor cantidad del plásmido recombinante. Para ello se usaron 50 μ l de bacterias químicamente competentes de *E. coli* (One Shot® TOP10 Competent Cells) a las que se añadieron 6 μ l del producto de ligación anterior, facilitando la transformación por incubación en hielo durante 30 minutos. Tras este paso se incubó la mezcla durante 30 segundos a 42 °C, y se refrigeró por incubación en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo se añadieron al tubo 250 μ l de medio SOC (medio de crecimiento bacteriano específico para el tratamiento de bacterias transformadas) y se incubó la mezcla 1 hora a 37 °C en agitación (de 200 a 250 rpm). Una vez transcurrido el tiempo de incubación se sembró el volumen total de la mezcla en una placa de medio sólido de LB con ampicilina (Boehringer Mannheim). Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. El plásmido contiene el gen de resistencia a la Ampicilina, que sirve para seleccionar las bacterias transformadas, al ser las únicas con capacidad de crecer en presencia de dicho antibiótico. El siguiente paso fue determinar si el plásmido contenía el inserto, para lo que se seleccionaron varias colonias y se crecieron individualmente en un tubo con 5 ml de

medio líquido de LB con Ampicilina incubándose toda la noche a 37 °C y en agitación. La presencia del inserto de interés en el plásmido se confirmó mediante la detección molecular del mismo.

9.3 Purificación del ADN plasmídico.

La obtención del ADN plasmídico se llevó a cabo con el equipo comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Aquellos caldos en los que crecieron bacterias con plásmido (apartado 9.2), se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 minuto para obtener un sedimento con las células bacterianas. Este se resuspendió en 250 µl de tampón P1 que lleva ribonucleasa para degradar el ARN. Una vez reconstituido, se añadieron 250 µl de tampón P2 y se mezcló invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces, rompiendo así la pared celular de las bacterias. Por último se añadieron 350 µl de tampón N3 que neutraliza la reacción anterior. Una vez mezclados los tres tampones, se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos, quedando un sedimento con los restos celulares y se añadió el sobrenadante a una columna QIAprep. La columna se lavó con 750 µl de tampón PE a 13.000 rpm durante 10 minutos, se retiró el filtrado y se volvió a centrifugar para secar el filtro de la misma. Por último la columna se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml al que se le añadieron 50 µl de agua destilada, tras 1 minuto de incubación se centrifugó durante 1 minuto y a 13.000 rpm para la obtención del purificado, que se conservó a – 20 °C hasta su utilización.

10 DESARROLLO DE UNA PCR EN TIEMPO REAL PARA EL VIRUS WEST NILE

Se eligió la región 3'NC de los WNV/KUNV. Para hacer la elección de los cebadores y la sonda, se introdujeron en el programa Primer Express (Primer Express® Software v2.0, Applied Biosystems) secuencias representativas de cada linaje, y en esta región se obtuvo una buena propuesta de cebadores y sondas que, tras ser modificados con introducción de posiciones degeneradas, fuesen teóricamente capaces de amplificar y detectar todos los posibles linajes de WNV. Los cebadores y la sonda están en proceso de ser protegidos mediante patente, por lo que no puede mostrarse su secuencia.

Es una PCR en tiempo real en dos pasos, consistiendo el primero en la obtención de ADNc de las muestras a analizar (SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen) y posteriormente amplificación por PCR (TaqMan® Universal PCR Master Mix, No Amperase® UNG, Applied Biosystem). Tanto los cebadores como la sonda utilizados están degenerados, para que nos permitan detectar la variabilidad genética presente entre los diferentes linajes en esta zona. La sonda es una sonda TaqMan MGB (*Minor Groove Binder*), que está doblemente marcada (donador-FAM-MGB-aceptor). El grupo MGB estabiliza el ADN, aumentando la temperatura de fusión (T_m) de la sonda, lo que permite el empleo de sondas más cortas aumentando así su sensibilidad y estabilidad. Si ambos fotocromos están unidos a la sonda, el donador no emite señal, pero cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa

(3'→5') de la Taq polimerasa, separa al fotocromo donador del resto de la sonda, permitiendo la emisión de una señal fluorescente. Durante la reacción se monitoriza la señal fluorescente del donador que se va acumulando en los sucesivos ciclos (Figura 21).

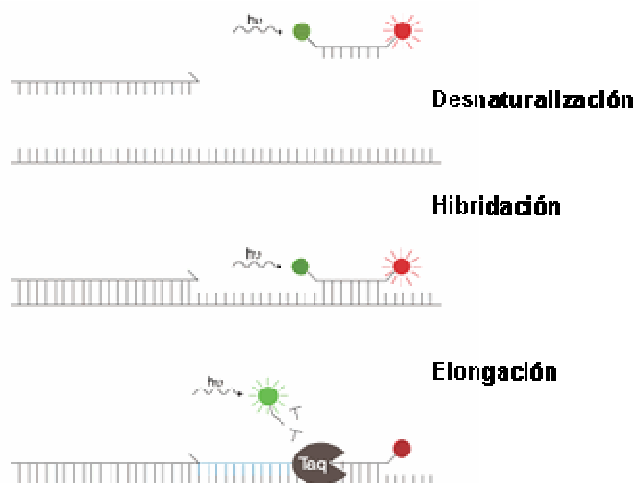


Figura 21. Esquema del funcionamiento de la PCR en tiempo real. Tras la desnaturalización, la sonda se fija durante la fase de hibridación y es en la fase de elongación cuando la polimerasa desplaza el extremo 5' de la sonda. Entonces la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa degrada ese mismo extremo y la ruptura continúa hasta la completa degradación de la sonda. Cuando el aceptor y donador quedan ambos liberados se da el aumento de la fluorescencia por parte del FAM (Adaptado de protocolos y técnicas de Cultek, <http://www.cultek.com>).

El parámetro a tener en cuenta en la optimización de la reacción fue el denominado ciclo umbral (Ct o *Threshold Cycle*), que es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de la fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y que es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas de molde.

10.1 Obtención de quimeras virales

Debido a la no disponibilidad de genoma viral perteneciente a los linajes 4 y 5 en el laboratorio, se construyeron ADN sintéticos que contenían las secuencias de los virus pertenecientes a cada uno de estos linajes, en concreto las secuencias correspondientes al NCBI AY277251 y DQ256376 respectivamente. Para ello se diseñaron dos cebadores que contuvieran en sus extremos las secuencias de los cebadores de la PCR en tiempo real seguidos de un fragmento de oligonucleótidos con la secuencia del virus que queríamos conseguir, de tal manera que ambos tuviesen un fragmento solapante de aproximadamente 20 nucleótidos para que pudiesen hibridar en la reacción de amplificación. Así para ambas quimeras se consiguieron fragmentos de unos 140pb, cuyos extremos se correspondían a los cebadores de la PCR en tiempo real y en el centro contenían la secuencia correspondiente al virus. Una vez obtenida esta banda, se purificó (apartado 4.2) y se clonó en plásmidos (apartado 9) para su posterior cuantificación

(medida de la cantidad de ADN en un espectrofotómetro) y ensayo en la PCR en tiempo real.

10.2 Obtención y optimización del control interno

Como control interno (CI) se usó un abordaje similar al descrito por (Fedele y cols., 2006), adaptado a nuestra técnica, para lo que se siguió el mismo proceso que para la obtención de las quimeras de los linajes 4 y 5. Es decir, se diseñó un fragmento que en los extremos contuviese las secuencias de los cebadores de la PCR en tiempo real y en el interior una secuencia exógena de un virus BK, detectable por la sonda descrita por Fedele y cols. para el CI. Se trata de una sonda TaqMan, pero marcada con otro fluorocromo, NED, evitando así interferencias con la diseñada para WNV. Los cebadores del CI y la PCR son los mismos, por lo que se trata de una PCR competitiva. Para llevar a cabo la optimización se partió de diluciones seriadas desde 10.000 a 1 copias/reacción y se utilizó agua estéril como control negativo, ensayándose todos ellos por duplicado. Las condiciones para preparar la mezcla de reacción fueron las siguientes:

Reactivo	Volumen
Agua estéril	17,2 μ l
Tampón 2x (Applied-Biosystem)	25 μ l
Cebador WNRT-F (100pmol)	0,4 μ l
Cebador WNRT-Re (100pmol)	0,4 μ l
Sonda CI (5 μ M)	2 μ l

A cada tubo se añadieron 45 μ l de la mezcla y 5 μ l de la muestra. La reacción comenzó con una desnaturalización inicial y la activación de la polimerasa durante 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 72 °C y finalizando con una elongación de 10 minutos a 72 °C.

10.3 Optimización y validación de la PCR en tiempo real

La cepa utilizada como molde fue la cepa de referencia Eg101 del linaje 1 de WNV. Se amplificó este fragmento primero en una PCR convencional, utilizando los cebadores diseñados para la PCR en tiempo real. El fragmento amplificado se purificó y clonó, cuyo plásmido resultante fue purificado, cuantificado y linearizado, tras lo cual se obtuvieron diluciones con concentraciones finales conocidas en número de copias/reacción para poder llevar a cabo la optimización. Se fueron variando en primer lugar la concentración de los cebadores (desde 10 a 40 pmol) y después la concentración de la sonda (desde 50 a 400 pmol).

Una vez optimizadas las condiciones de la reacción para el linaje 1, se procedió a la validación de la técnica, para lo que probó la amplificación con cada uno de los linajes descritos hasta la fecha (del 1 al 5) y con dos nuevos linajes propuestos en esta tesis doctoral. No se dispuso de muestras clínicas positivas, pero se utilizaron sueros y/o LCR de pacientes con cuadro clínico compatible con infección por WNV, en las que no hubo

detección en la PCR en tiempo real y en las que con otras técnicas diagnósticas se comprobó la no presencia del virus.

Finalmente se calculó la sensibilidad de la técnica para cada uno de los diferentes linajes (Ver resultados apartado 7.3). Para ello se utilizaron concentraciones para cada muestra que variaron desde 10^4 a 0,1 copias/reacción, ensayando por duplicado cada dilución.

Una vez conocido el límite de detección aproximado para cada linaje, se procedió a realizar un cálculo más preciso de la sensibilidad de la técnica. Para ello se realizó un ensayo en el que se probaron por cuadruplicado las concentraciones de 16, 4, 1, 1/4 y 1/16 copias/reacción (logaritmos en base 4) para los linajes 1, 2 y 3. La sensibilidad se calculó con la adaptación del método de *Reed-Muench* el cual nos da la información del EGD_{50} , que es el equivalente genómico detectado en el 50 % de los casos, y se basa en la siguiente fórmula:

$$EGD_{50} = \frac{(\% \text{ de los positivos de la concentración donde se detectan } > 50\%) - 50\%}{(\% > 50\%) - (\% \text{ de positivos } < 50\%)}$$

11 AISLAMIENTO VÍRICO

Todos los procedimientos que implicaron la presencia o uso de virus cultivado no inactivado se realizaron en las instalaciones de seguridad biológica de nivel 3 (NSB-3) disponibles en el Centro Nacional de Microbiología o en el Laboratorio Central de Veterinaria en Algete.

11.1 Aislamiento en cultivos celulares

Para la realización del aislamiento de los distintos virus se emplearon cultivos celulares de células Vero E6 (de riñón de mono verde), células C6/36 (de *Aedes albopictus*) y células RK13 (de riñón de conejo). En un caso puntual, también se intentó el aislamiento en dos modelos animales recomendados por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) (ver Materiales y métodos 11.2 y Resultados apartado 5.2). Se hicieron para cada línea celular tres pases en ciego a los siete días post-infección hubiese o no ECP.

11.1.1 Línea celular Vero e6

Es un linaje continuo de células epiteliales de riñón de mono verde africano. La línea Vero E6 deriva del clon de Vero 76 que presenta mayor susceptibilidad a la infección por algunos arbovirus. Las células fueron adquiridas de la *American Type Culture Collection* (ATCC - <http://www.lgcpromochem-atcc.com>).

Las células fueron mantenidas en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Sigma) suplementado al 5 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco-Invitrogen) al que previamente se le había añadido penicilina y estreptomycin (20.000 U/mL, Biowhitaker) y

L-Glutamina (200 mM, Biowhitaker). El crecimiento celular se realizó en una estufa a 37 °C y en un ambiente sin atmósfera de CO₂. Para el mantenimiento de la línea celular se realizaron pases seriados mediante desprendimiento del tapiz confluyente con tripsina-EDTA (PAA, Biostar), constituida por 5 g de tripsina, 2 g de EDTA y 8,5 g de NaCl. Una vez desprendido, se diluyó la tripsina-EDTA añadiendo la cantidad de medio de crecimiento adecuado para la realización de la dilución necesaria para hacer el pase en base a la superficie del recipiente a utilizar.

Para llevar a cabo las infecciones se utilizaron cultivos aproximadamente al 80 % de confluencia de la monocapa celular, en frascos de 25 cm² de superficie, frascos de 12,5 cm² y placas de 24 pocillos. En cada tipo de recipiente la infección se llevó a cabo de diferente manera:

- **Frascos de 25 cm² de superficie.** Se retiró el medio de los frascos y se añadieron 2 ml de EMEM al 2 % de SFB, tras lo cual se agregaron 100 ó 50 µl dependiendo de la muestra. Se dejó un frasco sin infectar como control de células. El inóculo viral se dejó adsorber 1 hora a 37 °C en agitación, y una vez transcurrido este tiempo se añadieron 7 ml de medio EMEM al 2 % de SFB y se incubaron en estufa a 37 °C en ausencia de CO₂, observándose diariamente al microscopio para detectar algún posible ECP.
- **Frascos de 12,5 cm² de superficie.** Se retiró el medio y se inocularon los frascos con 400 µl de una dilución 1/20 de la muestra. Se dejó un frasco sin infectar como control de células. El inóculo se dejó 1 hora en estufa de 37 °C en agitación, y una vez transcurrido este tiempo se añadieron a cada frasco 5 ml de EMEM al 2 % de SFB y se incubaron en estufa a 37 °C en ausencia de CO₂, observándose diariamente al microscopio para detectar algún posible ECP.
- **Placas de 24 pocillos.** En estas placas la superficie de cada pocillo es de 2 cm². Se retiró el medio de los pocillos y la muestra se inoculó en 4 pocillos con 200 µl de una dilución 1/20 y se dejaron otros 4 pocillos como control de células. El inóculo se dejó 1 hora de adsorción del virus, agitando la placa suavemente cada 15 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron a cada pocillo 1 ml de EMEM al 2 % de SFB. La incubación se hizo en estufa a 37 °C en ausencia de CO₂, observándose diariamente al microscopio para detectar algún posible ECP.

11.1.2 Línea celular C6/36/HT

Es una línea celular obtenida a partir de *Aedes albopictus* donada por el Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, Madrid. Es un clon de las C6/36 que se ha adaptado a crecer a 33 °C en vez de a 28 °C, mejorando así la capacidad de replicación viral.

Fueron cultivadas en EMEM al 2 % de SFB y suplementado al 1% de aminoácidos no esenciales (aa-NE), penicilina, estreptomycin y glutamina, y al 0,1% de vitaminas. El crecimiento celular se realizó en una estufa a 33 °C y en un ambiente sin atmósfera de CO₂. Para el mantenimiento de la línea celular se realizaron pases seriados tal como se ha expuesto anteriormente.

Para llevar a cabo la infección se utilizaron cultivos al 80 % de confluencia de la monocapa celular tanto en frascos de 25 cm² de superficie como en frascos de 12,5 cm². En cada tipo de recipiente la infección se llevó a cabo empleando el mismo protocolo que el descrito para las células Vero E6, con las diferencias necesarias para adecuarlo a las C6/36 como son: el medio de cultivo, la temperatura de incubación y la ausencia de CO₂.

11.1.3 Línea celular RK13

Es una línea de riñón de conejo (donada por el Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, Madrid) y está recomendada por la OIE para el crecimiento y aislamiento de WNV.

Las células fueron mantenidas en EMEM suplementado con glutamina, penicilina y estreptomina, todo ello al 1 % y al 5 % de SFB. El crecimiento celular se realizó en una estufa a 37 °C y en un ambiente sin atmósfera de CO₂.

La infección se llevó a cabo en placas de 24 pocillos utilizando el mismo protocolo que el empleado en las células Vero E6.

11.2 Aislamiento en modelos animales

Todos los ensayos que implicaron experimentación animal se realizaron en las instalaciones de seguridad biológica de nivel 3 (NSB-3) disponibles en el Laboratorio Central de Veterinaria en Algete. Se siguió la legislación vigente y, en particular, el Real decreto 1201/2005, del 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

11.2.1 Embriones de pollo

Se inocularon siete embriones de pollo de aves de corral que habían sido incubados de 9 a 11 días, dejando tres más como controles negativos. Antes de realizar la inoculación de la muestra, los huevos se miraron con el ovoscopio para ver si estaban embrionados y se marcó la posición del embrión y de la cámara de aire.

Ya en el laboratorio NSB-3 se inocularon dos de los embriones con 100 µl de la muestra pura y los cinco restantes con 100 µl de la muestra diluida 1/5 (100 µl de muestra + 400 µl de PBS). Para llevar a cabo la inoculación se desinfectó la zona de inoculación de los huevos con una torunda empapada en yodo, se hizo una incisión con un punzón en el borde de la cámara de aire, y en el lado contrario a donde estaba situado el embrión. La muestra se inoculó con una jeringa de 1 ml y tras llevarse a cabo la inoculación, el agujero se cerró con parafina caliente. Se identificó cada huevo con el número de registro, fecha y número de pase. La incubación se realizó de 35 °C a 37 °C y los huevos se fueron examinando al trasluz con el ovoscopio de tubo diariamente. En el caso de que hubiese embriones muertos en las primeras 24 horas tras la inoculación, serían considerados como fallos en la inoculación ó una posible contaminación.

Los embriones que se fueron encontrando muertos o moribundos, se refrigeraron a 4 °C y pasadas entre 4 y 24 horas a esta temperatura, se abrieron los huevos en cabina

de bioseguridad y se extrajo la mayor cantidad de líquido alantoideo (LA) que fue posible, para lo cual se desinfectó la zona superior con una torunda empapada en yodo, se quitó la cáscara y se extrajo el LA con una jeringa estéril de 10 ml con aguja. Cuando fue necesario se empleó una cucharilla metálica para extraer el líquido, tras lo cual se hizo una exploración visual del estado del embrión para detectar posibles signos de hemorragia. El LA se pasó a un tubo de 5 ml para conservarlo a -80 °C y además se recogieron 140 µl del mismo en un tubo que contenía 560 µl de AVL que inactivaría el virus y permitiría llevar a cabo una extracción del ARN viral para intentar detectar el genoma viral mediante PCRs genéricas para flavivirus.

11.2.2 Ratones lactantes

La vía de inoculación más sensible para WNV es la intracraneal (IC), especialmente en animales de 1 a 2 días de edad en los que la infección produce parálisis y otros signos de afectación del SNC (Guzman y Vazquez, 2002). Los ratones que se usaron en este experimento pertenecieron a la raza Swiss. Como controles de contacto se inocularon tres ratones de una camada de 1 día de vida, a los que se les inyectó 25 µl de cloruro sódico por vía IC al 0,1 % y los cuales fueron marcados para diferenciarlos de los inoculados con la muestra control. Además se inocularon dos ratones de la misma camada por vía IC con 25 µl de muestra pura. En 100 µl de cloruro sódico al 0,1 % se diluyó 25 µl de muestra y se inocularon cinco ratones con 25 µl de la dilución 1/5. Se sacrificó al resto de ratones de la camada.

Los ratones fueron mantenidos en instalaciones NSB-3 y se llevó a cabo un control diario de los síntomas de la enfermedad producida por la infección con WNV. Transcurrida una semana tras la inoculación, los animales fueron sacrificados y se recolectaron los cerebros de cada uno de ellos, los cuales fueron homogeneizados en un triturador de tejidos en 200 µl de EMEM y se clarificaron mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos (Lanciotti y cols., 2000). La colección de tejidos se analizó en condiciones de esterilidad en cabina y con material e instrumental estéril. El sobrenadante obtenido del procesamiento de los tejidos, se congeló a -80 °C para la posterior detección de virus o material genético.

12 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

12.1 Tinción negativa

En esta técnica utilizamos un cultivo de células C6/36 infectadas con un inóculo viral obtenido de un lote de mosquito que fue recogido cuando el ECP fue observado en el aproximadamente 80 % del tapiz celular y también utilizamos un cultivo celular sin infectar como control negativo.

El procedimiento consta de los siguientes pasos básicos: en primer lugar se retira el sobrenadante, y se inactivan y fijan las muestras con glutaraldehído al 2 % durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, tras una centrifugación a baja velocidad, se rompen las

membranas celulares del sedimento y se vuelve a centrifugar el sobrenadante para eliminar los restos celulares. A continuación se recoge el sobrenadante, el cuál se ultracentrifuga a 35.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente se realiza una adsorción a una rejilla y una tinción con ácido fosfotúngstico. Esta técnica se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía electrónica del CNM.

12.2 Inclusion (o ultramicrotoma)

Tras la fijación de la monocapa infectada, se realizaron diversos lavados con diferentes tampones y se procedió a la deshidratación de la muestra. Para ello se realizaron lavados con etanol a concentraciones crecientes. Una vez incluida la muestra en la cápsula se polimerizó en estufa y se obtuvieron cortes ultrafinos con el ultramicrotomo Ultracut (Leica), tiñendo mediante doble incubación en acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se visualizaron en el microscopio electrónico CM-12 (Phyllips) del Servicio de Microscopía electrónica del CNM, donde se llevó a cabo este proceso.

Resultados

1 BÚSQUEDA DE FLAVIVIRUS EN CULÍCIDOS Y FLEBOTOMOS

1.1 Detección de flavivirus

Se capturaron un total de 108.518 mosquitos, que se clasificaron en 6.607 lotes. Su análisis con la técnica descrita en el apartado 3.1 de Materiales y métodos, demostró la presencia de genoma de flavivirus en 311 lotes (Tabla 11).

De los resultados obtenidos en los vectores podemos resaltar que las especies más abundantes varían en los diferentes humedales, pero principalmente se correspondieron a *Oc. caspius* y *Cx. pipiens*, y las especies en las que se encontró un mayor número de lotes positivos para flavivirus fueron *Cx. theileri* y *Oc. caspius*. El porcentaje de insectos capturados en las diferentes áreas geográficas fue del 57,3 % en Andalucía, 16,0 % en Barcelona, 16,6 % en Tarragona y 10,0 % en Gerona, destacando que en Barcelona sólo se obtuvieron lotes positivos correspondientes a flebotomos y *Oc. caspius* y en Tarragona sólo en *Oc. caspius*. Es importante resaltar que Gerona fue el único lugar donde se capturaron *Ae. vexans*, en los que se detectaron secuencias de flavivirus en un 43,2 % del total de los lotes para esa área geográfica en cuestión. Otro importante resultado a destacar es la detección de flavivirus en flebotomos, cuyo hallazgo ha sido descrito hasta ahora sólo en el continente africano (Fontenille y cols., 1994).

Se secuenciaron los productos de amplificación obtenidos (143 pb) y se consideraron para el posterior análisis 87 pb que alineaban con la región genómica previamente secuenciada para los flavivirus y comúnmente utilizada para la realización de estudios filogenéticos (Kuno y cols., 1998, Billoir y cols., 2000, Gaunt y cols., 2001). Una vez obtenidas las secuencias se realizó una búsqueda de homología utilizando la herramienta BLAST, según se describe en el apartado 5 de Materiales y métodos. La mayoría de ellas dieron una mayor homología (aproximadamente del 80 %) con secuencias depositadas en la base de datos de virus descritos recientemente como flavivirus propios de insecto (CFAV, KRV y CxFV). Pero otro grupo de secuencias lo formaron ocho muestras, una de ellas mostró una homología del 90 % con cepas de WNV y las otras siete del 85 % con secuencias de los virus WNV, DENV, USUV y demás miembros de los MBV. Todas las secuencias obtenidas en este trabajo fueron diferentes a las disponibles en las bases de datos.

Especies	Huelva		Barcelona		Tarragona		Gerona		Total	
	Nº	Pos.	Nº	Pos.	Nº	Pos.	Nº	Pos.	Nº	Pos.
<i>Anopheles algeriensis</i>	19								19	
<i>An. atroparvus</i>	80				226		126	1	432	1
<i>An. claviger</i>	2								2	
<i>An. maculipennis</i>							1		1	
<i>An. plumbeus</i>	2		2						4	
<i>Anopheles sp.</i>	1		2				6		9	
<i>Aedes albopictus</i>			4						4	
<i>Ae. vexans</i>							37	16	37	16
<i>Ochlerotatus caspius</i>	1150	40	30	2	467	8	123	12	1770	62
<i>Oc. detritus</i>	307	1					9	1	316	2
<i>Oc. geniculatus</i>	1								1	
<i>Oc. pulcritarsis</i>			4						4	
<i>Ochlerotatus sp.</i>	4								4	
<i>Culex modestus</i>	156	1	1		313				470	1
<i>Cx. perexiguus</i>	71								71	
<i>Cx. pipiens</i>	1099	8	639		87		300	4	2125	12
<i>Cx. theileri</i>	636	199					53	2	689	201
<i>Culex sp.</i>	57	2							57	2
<i>Culiseta annulata</i>	41	2					6		47	2
<i>Cs. longiareolata</i>	80	1	160		1				241	1
<i>Cs. subochrea</i>	2		3						5	
<i>Culiseta sp.</i>	2	1	2						4	1
<i>Coquillettidia richiardii</i>	45		1		5				51	
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	1								1	
<i>Flebotomo sp.</i>	33	1	210	9					243	10
Total	3789	256	1058	11	1099	8	661	36	6607	311

Tabla 11. Resumen de las especies de mosquitos analizadas para este estudio. Se muestra el número de lotes analizados para cada especie, el lugar de captura y número de lotes positivos para flavivirus.

El análisis filogenético de las secuencias en este fragmento, confirmó con la topología del árbol obtenido la formación de estos dos grandes grupos, el primero formado por ocho secuencias agrupadas en la rama de los virus transmitidos por mosquitos (grupos 9 y 10) y el resto de las secuencias, formando diferentes grupos (grupos del 1 al 8), todos ellos próximos a la rama de los virus de mosquito (Tabla 12). El fragmento analizado es pequeño y los valores de certidumbre obtenidos por muestreo aleatorio (“*bootstrap*”) no son muy altos. A pesar de ello, la topología obtenida fue prácticamente la misma, repitiéndose la formación de estos 10 grupos, al realizar el análisis tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos con diferentes métodos de inferencia (Neighbor-Joining, Minimum Evolution, Maximum Parsimony, UPGMA) y de distancia (distancia-p, Kimura-2, Jukes-Cantor, Tajima-Nei, Tamura-Nei). En la Figura 22 se muestra uno de éstos análisis.

GRUPO	ESPECIES DE ARTRÓPODOS CON RESULTADOS POSITIVOS	ORIGEN GEOGRÁFICO Y AÑO DE CAPTURA
Grupo 1	<i>Cx. theileri</i> (203 secuencias)	HU 03-06
	<i>Cx. pipiens</i> (9 secuencias)	HU 03-06, GE 03-04
	<i>Oc. caspius</i> (7 secuencias)	HU 04, HU 06, GE 04
	<i>Ae. vexans</i> (2 secuencia)	GE 05
	<i>Culiseta annulata</i> (2 secuencia)	HU 04
	<i>Cs. longiareolata</i> (1 secuencia)	HU 04
	<i>Anopheles atroparvus</i> (1 secuencia)	GE 03
	Flebotomos (2 secuencias)	B 03, HU 05
Grupo 2	<i>Culex pipiens</i> (1 secuencia)	HU 02
	<i>Culex modestus</i> (1 secuencia)	HU 06
Grupo 3	<i>Oc. caspius</i> (39 secuencias)	B 02, B 05, T 02-05, GE 03-05, HU 04, HU 06
	<i>Cx. theileri</i> (3 secuencias)	HU 05-06
Grupo 4	Flebotomos (7 secuencias)	B 02-05
Grupo 5	Flebotomo (1 secuencia)	B 04
Grupo 6	<i>Oc. caspius</i> (4 secuencias)	HU 06
	<i>Oc. detritus</i> (1 secuencia)	HU 04
	<i>Culiseta annulata</i> (1 secuencia)	HU 04
Grupo 7	<i>Ae. vexans</i> (10 secuencias)	GE 01, GE 05
	<i>Oc. caspius</i> (1 secuencia)	GE 05
	<i>Oc. detritus</i> (1 secuencia)	GE 01
Grupo 8	<i>Ae. vexans</i> (4 secuencias)	GE 01, GE 03-04
	<i>Oc. caspius</i> (1 secuencia)	GE 03
	<i>Cx. pipiens</i> (1 secuencia)	GE 03
Grupo 9	<i>Oc. caspius</i> (7 secuencias)	HU 03, HU 05-06
Grupo 10	<i>Cx. pipiens</i> (1 secuencia)	HU 06

Tabla 12. Resumen de los diferentes grupos de flavivirus obtenidos. Se indica el vector al que se asocian, su origen geográfico y los años de captura. Entre paréntesis se muestra el número de secuencias obtenidas en cada especie y en negrita la especie mayoritaria. HU= Huelva, GE= Gerona, B= Barcelona y T= Tarragona.

En el caso de las secuencias relacionadas con los virus de mosquitos, podemos ver en la topología del árbol que forman ocho grupos diferentes, asociándose fundamentalmente al vector mayoritario en el que se han detectado. Podemos resaltar que el grupo 1 es el que contiene un mayor número de secuencias, presentes en una alta variedad de especies de insectos. Si nos fijamos en más detalle observamos como los grupos 1 y 2 representados principalmente por mosquitos del género *Culex*, están próximos a la rama de los virus de mosquito detectados en mosquitos *Culex* de Japón; y los grupos 7 y 8 (cuyo vector mayoritario es *Ae. vexans*) próximos a la rama de los virus de mosquitos detectados en mosquitos del género *Aedes*; quedando los grupos del 3 al 6 en varias ramas diferentes a las anteriores. En el caso de los grupos 9 y 10 se observa cómo están incluidos en la rama de los flavivirus transmitidos por mosquitos (MBV), aunque no se puede hacer un análisis más fino debido a la escasa información genómica aportada por el fragmento amplificado. El número total de secuencias incluidas en el análisis fue de 374 y se realizó sobre 87 nucleótidos.

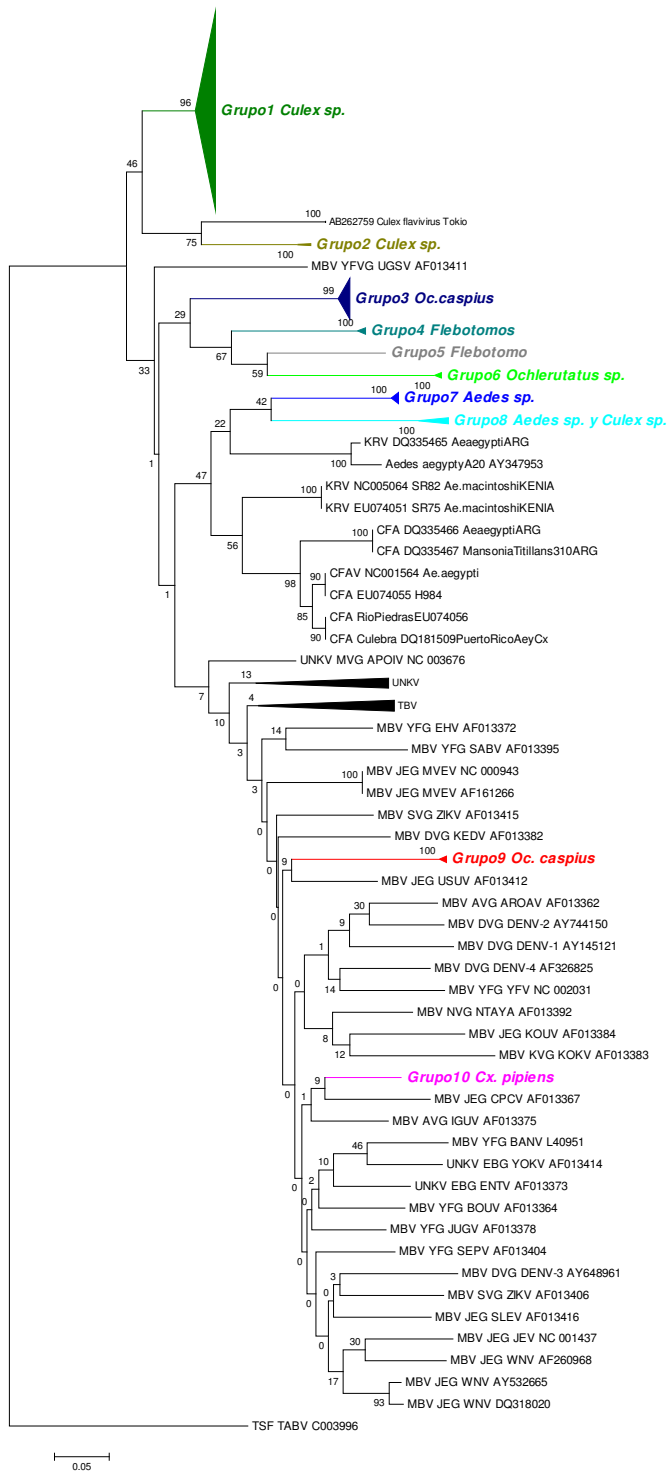


Figura 22. Árbol filogenético de los flavivirus basado en 87 nucleótidos del gen NS5. El método utilizado fue Neighbor-joining y el modelo distancia-p en el programa Mega 3.1 con un valor de certidumbre de 1000 réplicas. Se distinguen los 8 primeros grupos que forman los virus próximos a virus de mosquito y el 9 y 10 representan las secuencias de los virus relacionados a los MBV.

1.2 Detección de West Nile

De todas las muestras analizadas con la técnica descrita en el apartado 3.2 de Materiales y métodos, únicamente la muestra HU2925/06 dio un resultado positivo, lo que sugería la detección de WNV. El análisis de la secuencia amplificada (272 pb en este fragmento) confirmó la detección de genoma de WNV en mosquitos españoles.

En este caso, como el número de nucleótidos analizados es mayor, los valores de certidumbre son más altos, dando robustez a la topología del árbol, en el que podemos observar cómo la muestra de nuestro estudio se agrupa dentro de la rama de los virus West Nile, y no parece pertenecer a ninguno de los linajes conocidos hasta el momento (Figura 23). Un análisis más profundo se presenta en el apartado 3 de resultados.

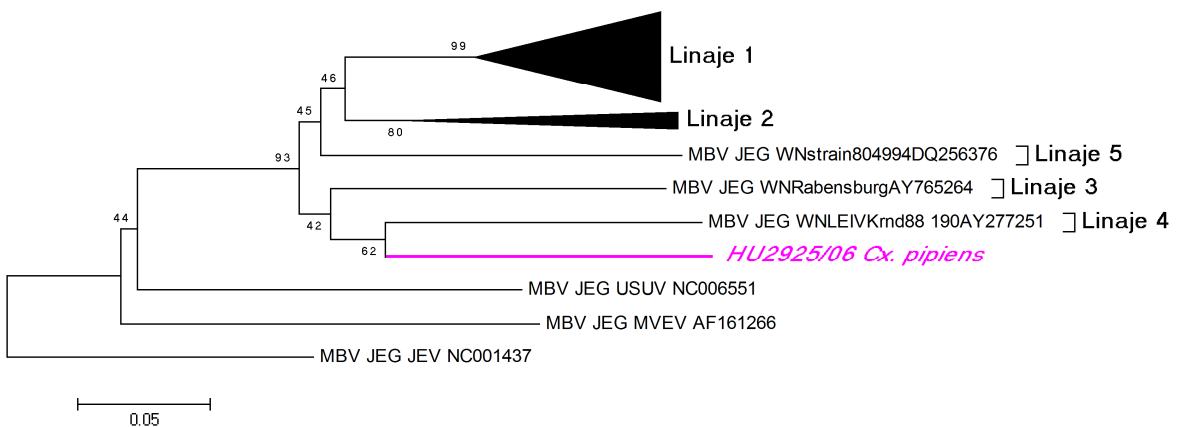


Figura 23. Árbol filogenético de los flavivirus basado en 272 nucleótidos del gen NS5. El método utilizado fue Neighbor-joining y el modelo distancia-p en el programa Mega 3.1 con un valor de certidumbre de 1000 réplicas. Como raíz se ha utilizado JEV. La secuencia detectada en este trabajo (HU2925/06) se muestra en morado, en cursiva y en negrita.

2 FILOGENIA DE FLAVIVIRUS

Con el objetivo de realizar un análisis filogenético en profundidad, se realizó una amplificación genómica de un fragmento de mayor tamaño en el gen NS5, utilizando la técnica descrita en el apartado 6.1 de Materiales y métodos. Para ello se hizo una selección, eligiendo un número de muestras representativas de cada uno de los 10 grupos, en los que se repartían las 311 muestras positivas. En total se analizaron 100 muestras consiguiendo amplificar 77 de ellas, correspondiéndose a seis de los 10 grupos. Los cuatro grupos de los cuales no se consiguió amplificación fueron: de los virus detectados en flebotomos (grupos 4 y 5), los dos lotes del grupo 2 y 7 de los 12 lotes analizados para el grupo 7. Aunque la muestra HU2925/06 (grupo 10) fue positiva con esta técnica, la amplificación fue débil y sólo pudieron secuenciarse 474 nucleótidos (datos no mostrados), cuyo análisis corroboró los resultados obtenidos previamente, pero no fue suficiente como para incluirla en el análisis global de filogenia de flavivirus (Tabla 13).

GRUPO / SUBGRUPO	ESPECIES DE ARTRÓPODOS CON RESULTADOS POSITIVOS	ORIGEN GEOGRÁFICO Y AÑO DE CAPTURA
Grupo 1 Sub1	<i>Cx. theileri</i> (13 secuencias) <i>Cx. pipiens</i> (1 secuencias)	HU 04-06 HU 04
Grupo1 Sub2	<i>Cx. theileri</i> (28 secuencias) <i>Cx. pipiens</i> (3 secuencias)	HU 03-06 HU 04, HU 06, GE 04
Grupo 3 Sub1 Cataluña	<i>Oc. caspius</i> (12 secuencias)	B 05, GE 03-05, T 02-03
Grupo 3 Sub2 Huelva	<i>Oc. caspius</i> (9 secuencias)	HU 04-06
Grupo 6	<i>Oc. caspius</i> (1 secuencia)	HU 06
	<i>Oc. detritus</i> (1 secuencia)	HU 04
	<i>Culiseta</i> sp. (1 secuencia)	HU 04
Grupo 8	<i>Ae. vexans</i> (2 secuencias codones terminación)	GE 01
Grupo 9	<i>Oc. caspius</i> (5 secuencias)	HU 03, HU 05-06

Tabla 13. Resumen de las secuencias obtenidas en el fragmento de 1.036 pb del gen NS5 de los diferentes grupos de flavivirus encontrados. Se indica el vector al que se asocian, su origen geográfico y el año de captura. Entre paréntesis se muestra el número de secuencias obtenidas en cada especie y en negrita la especie mayoritaria. HU= Huelva, GE= Gerona, B= Barcelona y T= Tarragona.

Una vez obtenidas, las secuencias se compararon con la información disponible en las bases de datos para cada una de las especies descritas hasta la fecha. El número total de secuencias incluidas en el análisis fue de 160 y se realizó sobre 1.036 pb. En el árbol filogenético inferido se pueden observar todos los grupos de virus previamente descritos para el género flavivirus: los virus transmitidos por mosquitos (MBV), los virus transmitidos por garrapatas (TBV) y los virus de vector desconocido (UNKV), así como los virus de insecto (CFAV, KRV y CxFV), todos ellos separados en diferentes ramas con valores de certidumbre mayores de 90 (Figura 24). Hay tres virus clasificados como UNKV encontrados en murciélagos (Sokoluk, Entebbe y Yokose), que se agrupan dentro de la rama de los MBV, de los cuales se postula que hayan tenido una pérdida secundaria del vector (Gould y cols., 2003).

En los resultados de este análisis, se puede observar como los grupos 1, 3, 6 y 8 junto con los virus CFAV, KRV y CxFV, definen una rama evolutiva marcadamente diferente de la definida por los flavivirus previamente aceptados como tales por el ICTV y que incluyen a los flavivirus con capacidad de replicación en células de vertebrado (MBV, TBV y UNKV). La topología del árbol filogenético obtenido para este nuevo grupo de flavivirus coloca a los grupos 1 y 8, detectados en *Culex* muy próximos a los virus de insecto descritos para *Culex* (CxFV); los grupos 3 y 6 detectados en *Ochlerotatus* (perteneciente al género *Aedes*) y los previamente asociados a *Aedes* sp (CFAV y KRV) parecen tener un origen evolutivo anterior a los que conforman la rama evolutiva de los flavivirus asociados a *Culex*. Dentro del grupo 8, se han obtenido dos secuencias en este fragmento en *Ae. vexans* que poseen dos codones de terminación, y no se pudo conseguir amplificación en este fragmento de un lote de *Cx. pipiens* de este mismo grupo.

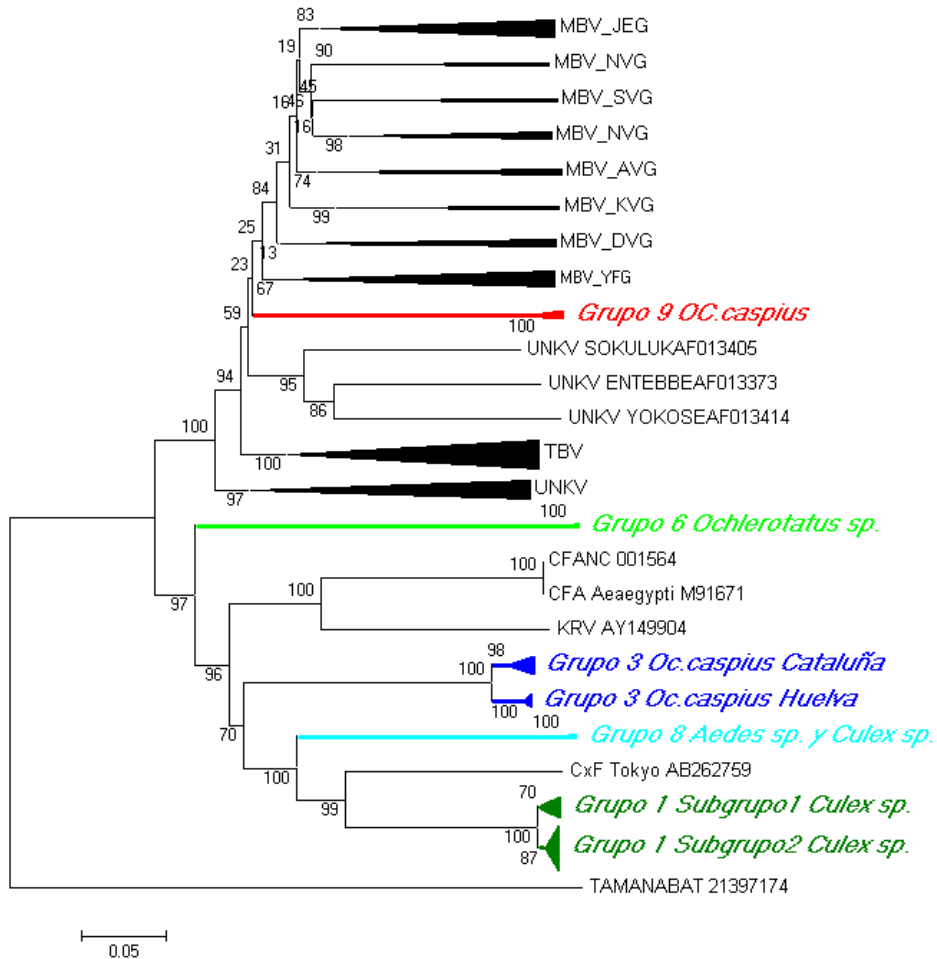


Figura 24. Árbol filogenético de los flavivirus basado en 1.036 nucleótidos del gen NS5. El método utilizado fue Neighbor-joining y el modelo distancia-p en el programa Mega 3.1 con un valor de certidumbre de 1000 réplicas. Como raíz se ha incluido el virus Tamana Bat.

Los análisis filogenéticos realizados parecen asociar las secuencias obtenidas con el vector en el cual se han detectado. Esta asociación al vector se ve reforzada por el hecho de que hay tres secuencias encontradas en *Cx. theileri* y que se agruparon con el análisis anterior (apartado 1.1 de resultados) en el grupo 3 de *Oc. caspius*, al disponer ahora de más información genética, se reagrupan dentro del grupo 1. Por otro lado, algunas secuencias encontradas en *Oc. caspius* con el análisis anterior se agrupaban en el grupo 1, ahora se incluyen en el grupo 3 donde éste es el vector mayoritario (comparar tablas 12 y 13). De hecho, con este nuevo análisis se pueden llegar a diferenciar dos subgrupos dentro de los grupos 1 y 3, destacando además que en el grupo 3, esta separación se asocia a la distribución geográfica de los vectores (capturados en Cataluña y en Huelva).

Con respecto al grupo 9, podemos observar en la topología del árbol obtenido, que se agrupa dentro de la rama de los MBV y parece definir un nuevo grupo evolutivo dentro de los MBV, diferente a los previamente reconocidos. Está formado por siete secuencias (iguales entre ellas) encontradas en siete lotes de *Oc.caspius* capturados en diferentes áreas de la ciudad de Huelva (Tabla 14).

CODIGO	FECHA	LUGAR	ESPECIE	Nº/ALIMENTADA
HU566	8/7/03	Celestino Mutis	<i>Ochlerotatus caspius</i>	15 (2 alimentadas)
HU2051	9/11/05	Los Álamos	<i>Ochlerotatus caspius</i>	39 (6 alimentadas)
HU2279	31/3/06	Palacio Doñana	<i>Ochlerotatus caspius</i>	50 (3 alimentadas)
HU3030	4/7/06	Los Álamos	<i>Ochlerotatus caspius</i>	24 (no alimentadas)
HU3346	29/8/06	Los Álamos	<i>Ochlerotatus caspius</i>	50 (no alimentadas)
HU3348	29/8/06	Los Álamos	<i>Ochlerotatus caspius</i>	20 (no alimentadas)
HU3354	30/8/06	Los Álamos	<i>Ochlerotatus caspius</i>	50 (no alimentadas)

Tabla 14. Datos identificativos de los lotes de mosquitos donde se encontraron las secuencias relacionadas a los flavivirus transmitidos por mosquitos (MBV). Los siete lotes de *Oc. caspius* se corresponden a una misma secuencia.

El estudio realizado de las distancias en aminoácidos entre los diferentes grupos de flavivirus secuenciados en esta zona, refuerzan las conclusiones obtenidas al analizar la topología del árbol (Tabla 15).

Grupos	MBV	TBV	UNKV	CFAV	KRV	CxFV	1	3	6	8	9
MTB	-										
TBV	31.8	-									
UNKV	38.3	35.2	-								
CFAV	51.7	50	50.7	-							
KRV	51.8	50.7	50.8	12.5	-						
CxFV	50.5	51.2	50.1	36	36.4	-					
1	51.3	51.8	50.1	35.4	35.7	13.8	-				
3	49.2	48.1	47.2	33.1	32.4	32	33.2	-			
6	52.4	52.6	54.3	43.8	43.4	47.4	45.8	45.6	-		
8	55.2	54.6	53.9	41.7	40.3	26.8	26.1	36.4	51.5	-	
9	29.6	30.5	37.6	50.1	49.4	50.7	50.7	46.1	53	53.4	-

Tabla 15. Porcentaje de las distancias en aminoácidos calculadas en el fragmento de 1.036 pb del gen NS5. Para realizar el cálculo se ha usado el método Neighbor-Joining y el modelo distancia-p. No se muestran para el virus Tamana Bat ya que éstas superan el 80% con el resto de los grupos.

El grupo 1 es el que posee la mayor homología con alguno de los grupos previamente conocidos, estando muy relacionado con los flavivirus previamente descritos detectados en mosquitos *Culex* (CxFV), coincidiendo así el vector en los que ambos grupos de virus se han encontrado. La distancia entre ambos grupos es pequeña (13,8 %), sobre todo si tenemos en cuenta que entre CFAV y KRV, que son virus muy relacionados, esta distancia es del 12,5 %, y que entre éstos y CxFV es de aproximadamente el 36 %. Así se podría inferir que el grupo 1 de los virus detectados en España son virus diferentes aunque muy relacionados a CxFV; sin embargo, sólo los estudios de filogenia sobre el genoma completo y los ensayos de neutralización confirmarían esta hipótesis. El grupo 3 está próximo a los tres virus de insecto previamente descritos y al grupo 1, con unas distancias que varían con respecto a cada grupo. De manera análoga, los grupos 6 y 8 presentan mayor homología con los virus de

insecto que con los MBV, TBV y UNKV. Por último podemos observar que el grupo 9 es más homólogo a los virus de los MBV (29,6%) que al resto de los flavivirus.

En esta zona de la proteína NS5, en la posición aminoacídica 210 de nuestro alineamiento, se encuentra el motivo de la replicasa viral (GDD) que está conservado en todas las secuencias detectadas en este trabajo (Figura 25). Y lo mismo ocurre para algunos de los residuos de cisteínas correspondientes a esta región (Tabla 15).

Posición aminoacídica	Grupos que la presentan
45	CxFV, 1, 3, 6, y 8
114	CxFV y Grupo 1
208	Grupo 9
213	UNKV, TBV, MBV
257, 276	Conservado en todos
301	Grupos 1, 3 y 8, CFAV, KRV, CxFV, UNKV, TBV y MBV (excepto algunos YFG y UNKV de murciélagos)
328	Grupos 6, 9, TBV y MBV

Tabla 16. Resumen de los residuos de cisteínas presentes en la región de la proteína NS5 encontrados en las muestras de nuestro estudio.

Cabe destacar que, en las secuencias obtenidas en este trabajo, el residuo 45 está presente sólo en nuestros grupos de virus de insecto (1, 3, 6 y 8) y no en el grupo 9 que está relacionado a MBV. Y por el contrario, el residuo 208 está presente sólo en las secuencias del grupo 9 y en ningún otro flavivirus. Por otra parte, la cisteína 114 está presente sólo en los virus de insecto que se han encontrado en mosquitos del género *Culex*. También es importante destacar un sitio de glicosilación $_{83}\text{NES}_{86}$ que está presente exclusivamente en las secuencias detectadas en *Oc.caspicus* del grupo 3, pero no en las del grupo 9 (Figura 25 y tabla 16) ni en el resto de flavivirus.

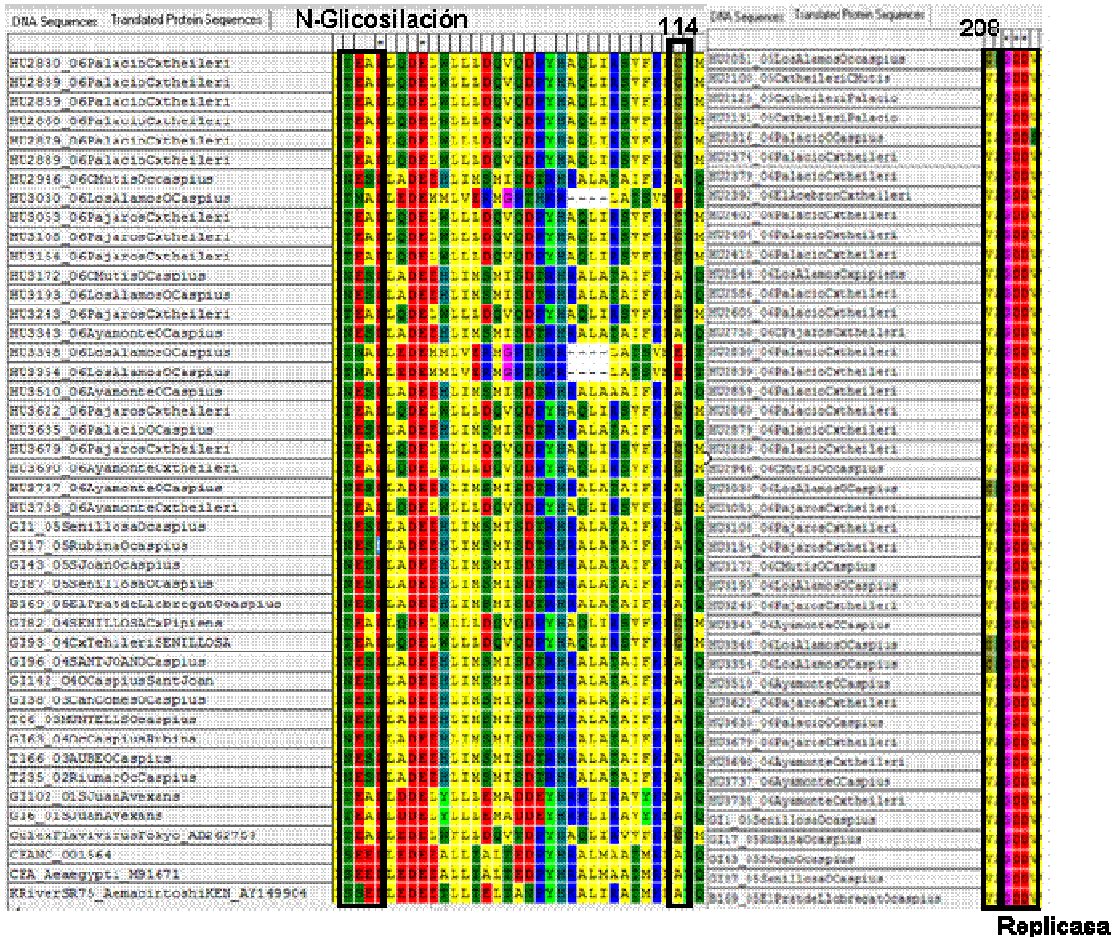


Figura 25. Representación en aminoácidos de sitios de interés de la proteína NS5 de los flavivirus de insecto. Se muestran el motivo de la replicasa viral, dos residuos de cisteínas y un sitio de N-Glicosilación conservados en todas las secuencias.

Para confirmar los resultados obtenidos previamente, se realizó un análisis filogenético utilizando una aproximación diferente a la anterior, en este caso el método usado fue el de Máxima verosimilitud (ML- *Maximum likelihood*) tanto en el programa Phylip como en el PAUP. Se analizaron las 71 secuencias obtenidas en este trabajo relacionadas con los virus de insecto (correspondientes a los grupos 1, 3, 6 y 8), junto a las 4 únicas secuencias disponibles para esta zona de virus de insecto, dos pertenecientes a CFAV, una a KRV y otra a CxFV y la secuencia de TABV, que se usó como raíz. En la topología del árbol (Figura 26), se pueden observar las relaciones filogenéticas entre los cuatro grandes grupos de virus obtenidos en los lotes analizados. Se confirma que los grupos 1, 8 y 3 estarían evolutivamente relacionados con CxFV y se mantiene la discriminación de dos subgrupos según el origen geográfico en el grupo 3. El grupo 6 obtenido de lotes de *Culisetas* y *Ochlerotatus* define aquí un grupo evolutivo independiente del anterior y del que forman los virus asociados a Aedes CFAV y KRV.

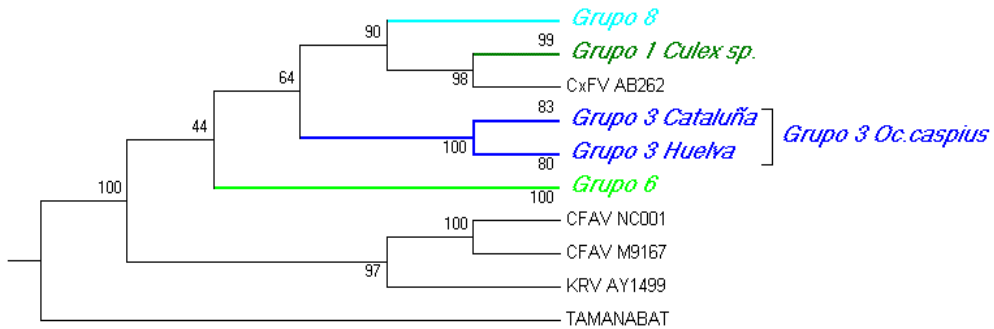


Figura 26. Árbol evolutivo de los flavivirus de insecto, basado en 1036 pb del gen NS5. El método utilizado fue Maximum Likelihood (ML) y tanto con el programa Phylip como con el PAUP, la topología fue similar. El análisis se realizó en nucleótidos y se empleó TABV como raíz.

Con la misma metodología se realizó el análisis de las secuencias obtenidas del grupo 9. En este análisis se incluyeron 45 secuencias disponibles en la base de datos de los MBV, las cinco secuencias obtenidas del grupo 9 y una secuencia de TBEV que se usó como raíz. En la topología del árbol se puede observar cómo el grupo 9 está claramente dentro de la rama de los MBV y parece definir una nueva rama evolutiva (Figura 27).

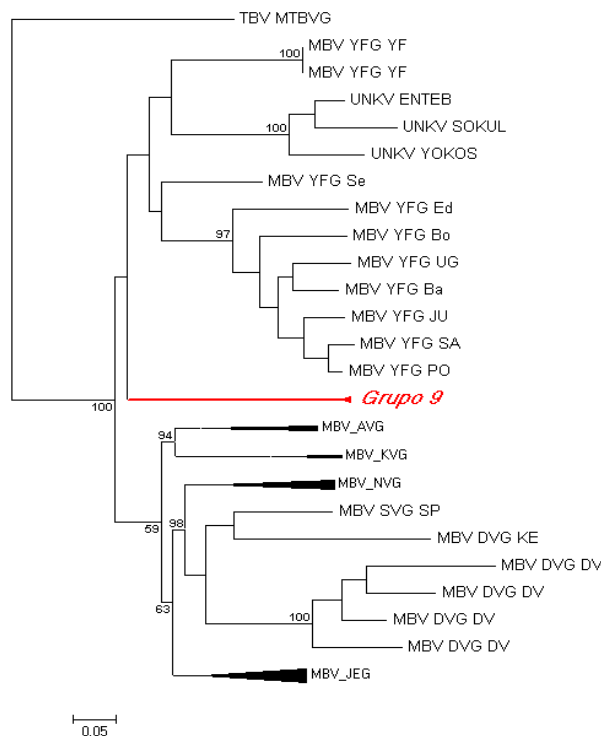


Figura 27. Árbol evolutivo basado en 1.036 pb del gen NS5 de los flavivirus del grupo 9 detectados en *Oc. caspius* en España. El método utilizado fue ML y tanto con el programa Phylip como en el PAUP, la topología fue similar. El análisis se realizó en nucleótidos y se empleó TBEV como raíz.

3 COMPROBACIÓN DE LA EXISTENCIA DE ARN DE FLAVIVIRUS

Para llevar a cabo este análisis se eligió una muestra representativa de los grupos del 1 al 9. Cuando en un grupo de secuencias había varias especies de insectos, se realizó esta prueba en una muestra de cada una de las especies representadas. En los resultados podemos observar cómo hay cuatro grupos (2, 6, 7 y 8) en los que la secuencia de flavivirus es ADN (resiste al tratamiento con ribonucleasa) y, por tanto, probablemente está integrada en el genoma del mosquito (Figura 28 y Tabla 17).

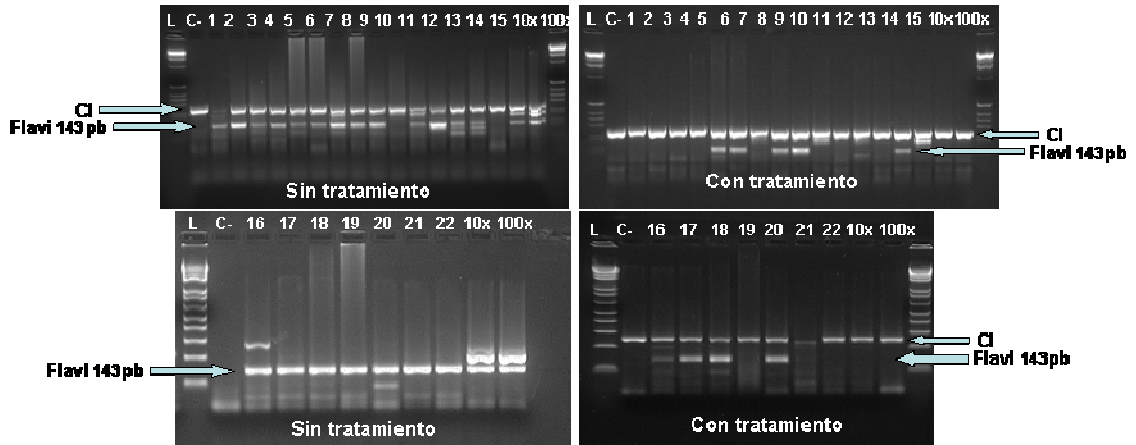


Figura 28. Resultados de la prueba de la ribonucleasa. Se muestran los resultados del tratamiento con ARNasa de 22 muestras. Puede observarse cómo en las muestras 10 y 15 el ARN de partida ya estaba degradado, y que las muestras 6, 7, 9, 14, 16, 17, 18 y 20 son de ADN. El resto se corresponden a ARN.

El grupo 2 está formado por dos lotes obtenidos en Huelva con mosquitos del género *Culex* sp., la prueba se realizó en ambas muestras, pero sólo es fiable en el lote de *Cx. modestus*, ya que en el de *Cx. pipiens* el ARN estaba degradado. Es la primera vez que se describe ADN de flavivirus en mosquitos del género *Culex*, ya que hasta la fecha sólo se ha reportado en mosquitos del género *Aedes* (*Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*) (Crochu y cols., 2004). Los otros tres grupos en los que hemos detectado ADN, se corresponden a las especies *Oc. caspius*, *Ae. vexans* y *Oc. detritus*, en las cuales tampoco se había descrito previamente genoma de flavivirus integrado. En el resto de grupos (1, 3, 4, 5 y 9) las secuencias detectadas son ARN. Hubo dos muestras en las que la prueba de la degradación resultó dudosa, pues en un primer ensayo mostró ser sensible a tratamiento con ARNasas y en el otro no; no pudo realizarse un tercer ensayo al no quedar más muestra disponible.

ARN/ADN	GRUPO	ESPECIES DEL GRUPO	Amplificación 1.036 pb.
ARN	Grupo 1	<i>Culex sp.</i> (4 lotes)	SI
ARN		<i>Culiseta sp.</i> (1 lote)	
ARN		<i>Anopheles atroparvus</i> (1 lote)	
ADN	Grupo 2	<i>Culex sp.</i> (1 lote)	NO
ARN	Grupo 3	<i>Oc. caspius</i> (4 lotes)	SI
ARN		<i>Cx. theileri</i> (2 lotes)	
ARN	Grupo 4	Flebotomos (4 lotes)	NO
ARN	Grupo 5	Flebotomo (1 lote)	NO
ADN	Grupo 6	<i>Oc. caspius</i> (3 lotes)	SI
Dudosa		<i>Cs. annulata</i> (1 lote)	
ADN	Grupo 7	<i>Ae. vexans</i> (3 lotes)	NO
Dudosa		<i>Oc. caspius</i> (1 lote)	
ADN	Grupo 8	<i>Ae. vexans</i> (1 lote)	SI
ADN		<i>Oc. caspius</i> (1 lote)	
ARN	Grupo 9	<i>Oc. caspius</i> (3 lotes)	SI

Tabla 17. Resultados de la prueba de la ribonucleasa. Entre paréntesis se indican el número de lotes analizados para cada especie, en negrita la especie mayoritaria del grupo y en rojo las muestras en las que se encontró ADN de flavivirus. La última columna se corresponde a los resultados de amplificación del fragmento de 1.036 pb en el gen NS5 para los lotes analizados.

4 ANÁLISIS MOLECULAR DEL VIRUS KJ502/66

Los datos preliminares, descritos en el apartado 1.2 de Resultados, indican que la muestra HU2925/06 no se puede asignar a ninguno de los cinco linajes evolutivos previamente descritos para WNV. Un análisis en profundidad de los antecedentes disponibles, permite identificar la existencia de otra cepa (KJ502/66) que tampoco se agrupa con ninguno de los linajes previamente descritos cuando se analizan las secuencias conocidas en el gen de la envuelta (Scherret y cols., 2001, Bakonyi y cols., 2005, Bondre y cols., 2007).

Con el objeto de clasificar filogenéticamente este virus y de compararlo con las secuencias de HU2925/06 conocidas, se secuenció su genoma completo. Para ello, se diseñaron 44 cebadores capaces de amplificar cualquiera de los linajes evolutivos conocidos. Con ellos se amplificaron un total de 22 fragmentos cuya secuenciación y análisis permitió reconstruir la secuencia de 10.921 nucleótidos de su genoma (Figura 29). La poliproteína, codificada por las posiciones 51 a 10.350 del genoma secuenciado, tiene una longitud de 3.440 aminoácidos.

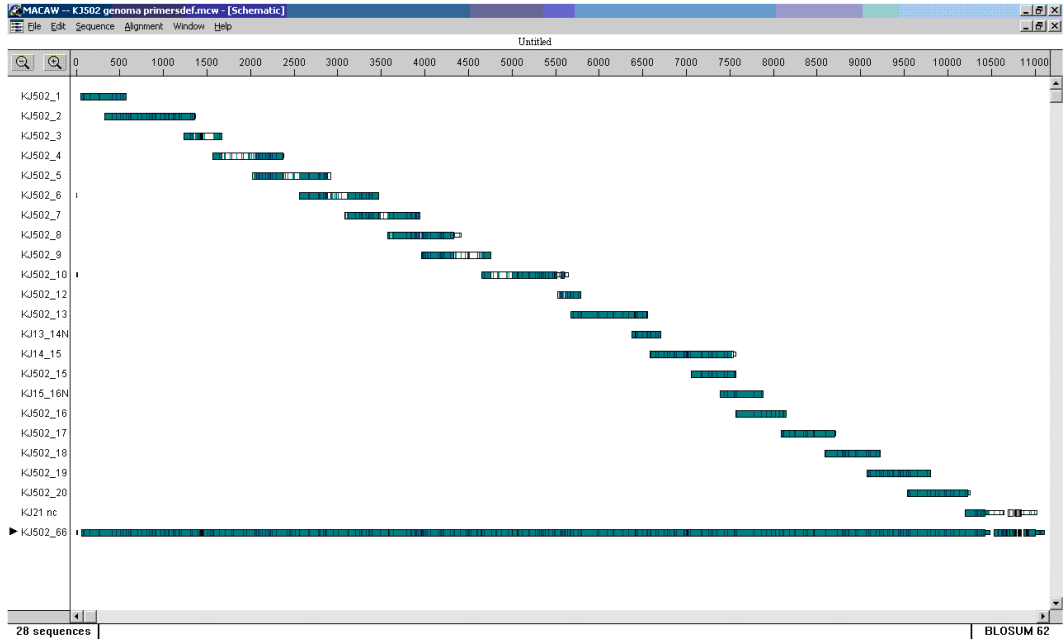


Figura 29. Esquema de la estrategia seguida para la amplificación del genoma completo de la cepa KJ502/66. Se muestra la obtención de los diferentes fragmentos, con extremos solapantes con los que les flanqueaban.

Para analizar su organización genómica, se comparó su secuencia en aminoácidos con la de la cepa de NY99 AF196835 (Lanciotti y cols., 1999). En nuestra secuencia al extremo 5' (comprende desde el inicio de la secuencia hasta la primera metionina) le faltan 55 nucleótidos y al extremo 3' (comprende desde el primer codón de terminación hasta el final de la secuencia) le faltan otros 18 nucleótidos, que no han podido ser secuenciados. En los extremos, al ser regiones no codificantes, los alineamientos se han hecho en nucleótidos y en el resto del genoma, la poliproteína, se ha hecho en aminoácidos.

Para realizar un análisis genético exhaustivo, se buscaron homologías en nuestra secuencia con varios patrones aminoacídicos de interés descritos previamente para flavivirus y para otros WNV. El objetivo era determinar los sitios de división de la poliproteína viral, localizar residuos de cisteínas y sitios de glicosilación conservados, calcular las distancias genéticas entre los diferentes linajes de WNV y otros flavivirus y realizar un estudio filogenético completo (Figura 30).

Name	From	To	#Sites	Coding?	Codon Start
<input checked="" type="checkbox"/> Genes/Domains					
<input checked="" type="checkbox"/> 5NC	1	99	99	<input type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/> C	100	480	381	<input checked="" type="checkbox"/>	1st site
<input checked="" type="checkbox"/> M	481	981	501	<input checked="" type="checkbox"/>	1st site
<input checked="" type="checkbox"/> E	982	2484	1503	<input checked="" type="checkbox"/>	1st site
<input checked="" type="checkbox"/> NS1	2485	3543	1059	<input checked="" type="checkbox"/>	1st site
<input checked="" type="checkbox"/> NS2a	3544	4233	690	<input checked="" type="checkbox"/>	1st site
<input checked="" type="checkbox"/> NS2b	4234	4626	393	<input checked="" type="checkbox"/>	1st site
<input checked="" type="checkbox"/> NS3	4627	6483	1857	<input checked="" type="checkbox"/>	1st site
<input checked="" type="checkbox"/> NS4a	6484	6930	447	<input checked="" type="checkbox"/>	1st site
<input checked="" type="checkbox"/> NS4b	6931	7704	774	<input checked="" type="checkbox"/>	1st site
<input checked="" type="checkbox"/> NS5	7705	10419	2715	<input checked="" type="checkbox"/>	1st site
<input checked="" type="checkbox"/> 3NC	10420	11112	693	<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> Independents			0	<input type="checkbox"/>	

Figura 30. Organización del genoma completo de KJ502/66. Selección de cada gen llevada a cabo en el alineamiento realizado con el programa Mega 3.1 antes de realizar el cálculo de las distancias.

En cuanto a los residuos de cisteína (que pueden formar puentes disulfuro inter e intramoleculares), se han encontrado conservados entre los diferentes flavivirus en los genes preM (6), NS1 (12) y envuelta (12), todos ellos presentes en nuestra cepa de estudio. En el gen NS3 están presentes en la cepa KJ502/66 los 6 residuos de cisteína que se encuentran conservados en el resto de WNV, como los 13 del gen NS5.

De la proteína de la envuelta (E) podemos destacar la presencia en nuestra secuencia del pentapéptido DTGHG_{317→321} específico para los virus del JEG. En esta región se han descrito además, algunos residuos que podrían ser marcadores de neurovirulencia; uno de los más importantes es el punto de glicosilación (NYS) de la posición aminoacídica (154→156), que ha desaparecido en algunas cepas del linaje 2 de WNV y en otras ha mutado en alguno de sus aminoácidos perdiendo así la capacidad de glicosilación, lo que se ha asociado a una pérdida de la neurovirulencia en ratones. Este sitio en la cepa KJ502/66 está mutado (NYS→NYP). Además, se ha demostrado que en esta zona hay otros sitios implicados en la atenuación viral, como son las sustituciones en los residuos 68 (L), 277 (N) y 307 (K), que no se han dado en la cepa KJ502/66 analizada en este trabajo. Esta cepa conserva también el motivo RGE_{388→390} de unión a integrina, del cual se sospecha ser un determinante de patogenicidad viral (Bakonyi y cols., 2004).

MBV JEG WNNY2002BroomDQ164187	G	N	Y	S	T	Q
MBV JEG WNNY2003Rock1DQ164192	G	N	Y	S	T	Q
MBV JEG WNIItaly1998_equineAF404757	G	N	Y	S	T	Q
MBV JEG WNLEIVVlg99_27889AY277252	G	N	Y	S	T	Q
MBV JEG KunjinpAKUNAY274505	G	N	Y	F	T	Q
MBV JEG WNgoshawk_Hungary04DQ116961	G	N	Y	S	T	Q
MBV JEG WNArD76104DQ318019	G	---	---	---	---	K
MBV JEG WNF CGM12294	G	---	---	---	---	K
MBV JEG WNH442_EF429200HSA	G	N	Y	S	T	Q
MBV JEG WNB956AY532665	G	---	---	---	---	K
MBV JEG WNSA93/01_EF429198HSA	G	N	Y	S	T	Q
MBV JEG WN_SA381/00_EF429199HumanSA	G	N	Y	S	T	Q
MBV JEG WNSPU116/89EF429197HSA	G	N	Y	S	T	Q
MBV JEG WNNCO01563	G	---	---	---	---	K
MBV JEG WNSarafendAY688948	G	N	Y	S	T	Q
MBV JEG WNM MadagascarAnMg798DQ176636	G	N	Y	P	T	Q
MBV JEG WNArB3573_82DQ318020	G	D	Y	S	T	Q
MBV JEG WNRabensburgAY765264	G	N	Y	S	T	Q
MBV JEG WNLEIVKrnd88_190AY277251	G	N	M	A	Q	
MBV JEG WNstrain804994DQ256376	G	N	Y	A	T	Q
MBV JEG KJMP502_66	G	N	Y	P	T	Q

Figura 31. Sitio de glicosilación de la envuelta de los WNV. La secuencia de nuestra cepa ha perdido el sitio de glicosilación cambiando la serina por una prolina (NYS→NYP).

En cuanto a la proteína NS3 cabe destacar la presencia en nuestra secuencia de los motivos asociados con las actividades de proteasa (H₅₁, D₇₅ y S₁₃₅) y helicasa (GAGKT_{197→201}, DEAH_{285→288} y GRIGRN_{460→465}). También están conservados los motivos metiltransferasa (VIDLGCGRGGW_{77→87}) y replicasa (GDD_{667→669}) en la proteína NS5. En la zona 3'NC se encuentran las regiones CS1 (CAGCATATTGAC), y la CS2 (AAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCC), la cuales se encuentran conservadas entre los diferentes MBV (Tajima y cols., 2005). Ambas secuencias son idénticas en la cepa KJ502/66 al resto de las descritas en los WNV, y están implicadas en la formación de estructuras secundarias. Se ha demostrado que mutaciones en esta zona y que afecten a estas regiones, van acompañadas de una reducción de la eficacia de la replicación viral y de una alteración de la infectividad (Men y cols., 1996, Proutski y cols., 1999).

Por último, se buscaron los sitios de corte de la poliproteína viral por proteasas virales y por signalasas y furinas del hospedador, comparándose con los descritos para WNV y otros flavivirus, y pudo observarse que los motivos de la serín-proteasa están muy conservados y menos los de la signalasa del hospedador, aún así los cambios presentes en estos motivos no deberían afectar a la efectividad de las enzimas responsables del corte, al mantenerse los aminoácidos de reconocimiento bastante conservados entre todos los linajes (Tabla 18)(Rice y Strauss, 1990, de Lamballerie y cols., 2002). La mayoría de los sitios fueron identificados a partir del esquema descrito por Rice y Strauss en 1990 de los sitios proteolíticos para flavivirus.

Virus	Cv/Ci SP	Ci/prM SH	prM/M F	M/E SH
Linaje 1	SKQKKR/GGKTGI	IASVGA/VTLSNF	SRRSRR/SLTVQT	VAPAYS/FNCLGM
Linaje 2	TKQKKR/GGTAGF	IACAGA/VTLSNF	SRRSRR/SLTVQT	VAPAYS/FNCLGM
Linaje 3	EKKKKR/GGSIGV	MTGAGA/VTLSNF	SRRSRR/SLTVQT	VAPAYS/FNCLGM
Linaje 4	GKQK-R/GGTGVV	IACASA/VTLSNF	SRRSRR/SLNVQV	VAPAYS/FNCLGM
Linaje 5	TKQKKR/GGVVGV	VACVGS/VTLSNF	SRRSRR/SLTVQA	VAPAYS/FNCLGM
KJ 502/66	TKQKKR/GGTMGI	IACCGA/VTLSNF	SRRSRR/SLTVQT	VAPAYS/FNCLGM
	E/NS1 SH	NS1/NS2A SH	NS2A/NS2B SP	NS2B/NS3 SP
Linaje 1	SVNVHA/DTGCAI	SQVNAY/NADMID	DPNRKR/GWPATE	LQYTKR/GGVLWD
Linaje 2	SVNVHA/DTGCAI	SRVNAY/NADMID	DPNRKR/GWPATE	LQYTKR/GGVLWD
Linaje 3	SANVHA/DTGCAI	SRVSAY/KSDMID	DPNRKR/GWPATE	LQYTKR/GGVLWD
Linaje 4	SVNVHA/DTGCAI	SKVTAY/NADMID	DPNRKR/GWPATE	LQYTKR/GGVLWD
Linaje 5	SINVHA/DTGCAI	SQVNAY/NADMID	DPNRKR/GWPATE	LQYTKR/GGVLWD
KJ 502/66	SVNVHA/DTGCAI	SKVNAY/NADMID	DPNRKR/GWPATE	LQYTKR/GGVLWD
	NS3/NS4A SP	NS4A/NS4B SH	NS4B/NS5 SP	
Linaje 1	FASGKR/SQIGLI	VSAAVA/NEMGWL	KPGLKR/GGAKGR	
Linaje 2	FASGKR/SQIGLV	VSAAVA/NEMGWL	KPGLKR/GGAKGR	
Linaje 3	FAAGKR/SQIGLV	ISAVAA/NEMGWL	KPGLKR/GGAKGR	
Linaje 4	FAAGKR/SQIGLV	VGTVA/NEMGWL	KPGLKR/GGAKGR	
Linaje 5	FASGKR/SQVGLI	VGAVAA/NEMGWL	KPGLKR/GGAKGR	
KJ 502/66	FASGKR/SQIGLV	VSAAVA/NEMGWL	KPALKR/GGAKGR	

Tabla 18. Sitios de corte propuestos para la poliproteína de los WNV. SP- Serin-Proteasa viral, SH- Signalasa del hospedador, F- Furina.

Para llevar a cabo el análisis de reconstrucción filogenética se usó el modelo Tamura-Nei con un valor gamma de 0,4707, que fue el mejor modelo seleccionado por Modeltest. La topología del árbol, obtenido usando el programa MEGA 3.1, muestra que la cepa KJ502/66 está claramente separada del resto del resto de linajes de WNV descritos hasta la fecha y parece definir un nuevo linaje (Figura 32).

Para realizar un análisis de su genoma más en profundidad, se calcularon las distancias genéticas, tanto en nucleótidos como en aminoácidos, entre los seis grupos de WNV. Se analizaron cada una de las proteínas virales por separado y la secuencia codificante del genoma, utilizándose como genomas relacionados los de JEV y USUV. Los datos obtenidos muestran que la distancia en nucleótidos de KJ502/66 con el resto de los linajes de WNV es superior al 20 %, equivalente a la que existe cuando se comparan el resto de los linajes entre sí (Tabla 19). Además podemos observar que la cepa de estudio presenta una mayor distancia genética con el linaje 4 y una mayor proximidad con el linaje 2. Los cambios en nucleótidos de la cepa están dispersos por todo el genoma y no se acumulan en ningún gen en concreto.

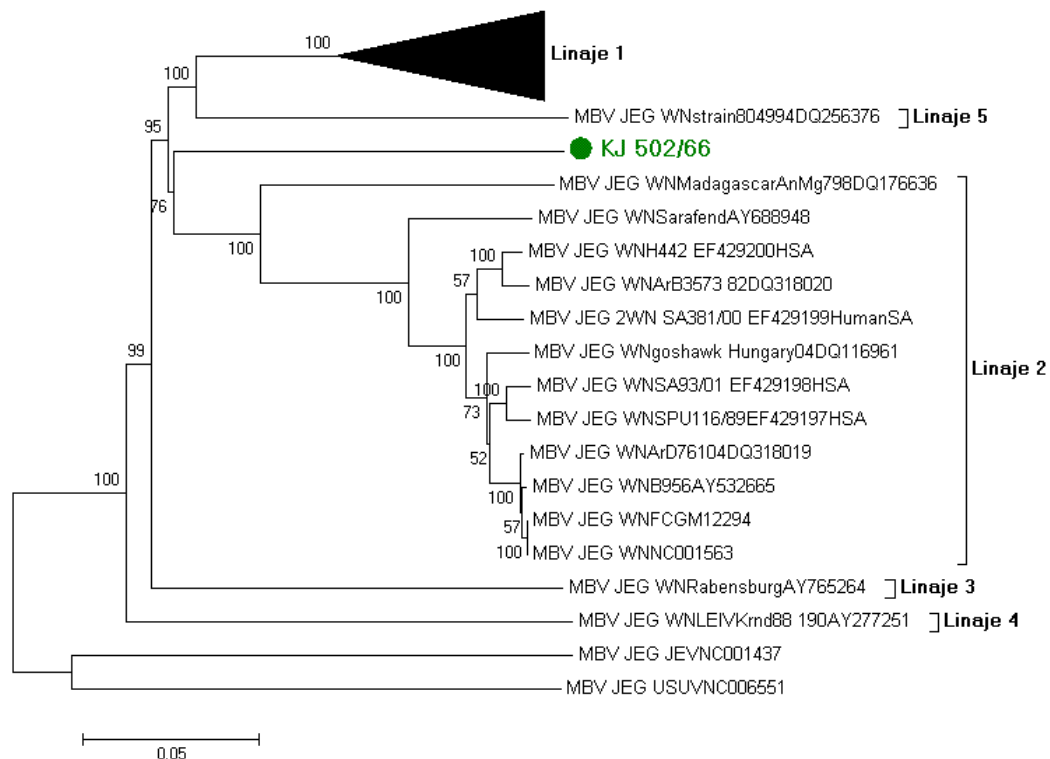


Figura 32. Árbol filogenético del genoma completo de KJ502/66. Se destacan los diferentes linajes con valores de bootstrap significativos para cada uno de ellos. JEV y USUV se usaron como raíz.

Las distancias entre los diferentes linajes de cada proteína viral por separado, indican que la cepa KJ502/66 está más relacionada con los linajes 1, 2 y 5 que con el 3 y 4. Además podemos observar que las proteínas más conservadas son la NS2b y la NS5 con unas distancias que varían entre 2,6-7,4 % en aminoácidos y entre el 17,5-22,9 % en nucleótidos, siendo las más divergentes las proteínas estructurales C, preM/M y E con unas distancias del 4,8-24,6 % en aminoácidos y del 12,9-28,1 % en nucleótidos.

KJ502/66	C	preM/M	E	NS1	NS2a	NS2b	NS3	NS4a	NS4b	NS5	Codificante
1	16,4 13,3	23,8 5,5	21,3 6,7	24,2 12,2	23,9 13,4	17,5 2,6	22,4 6,2	22,1 10,8	23,2 8	20,7 5	21,8 7,5
2	12,9 8,2	22,5 4,8	21,1 7,6	22,6 10,3	23,9 14,5	19,5 4,9	21,9 7,1	24,5 6,3	21,9 6,6	19,8 4,3	21,2 7
3	21,6 24,6	25,9 10,2	22,3 11,4	24,8 15,6	26,5 16,8	19,6 5,6	23,8 8,9	24,6 10,7	27,4 12,2	22,9 6,8	23,8 10,7
4	20,8 15,6	27,3 18,6	28,1 17,9	24 13	26,4 18,6	19,6 7,2	24,8 10,2	26,6 14,8	25,7 11	22,7 7,4	24,7 12,2
5	18,9 12,3	24 10,8	22,9 8,9	25 13,9	22,9 14,2	19,1 6,4	21,7 7,4	25,3 10,7	24,5 9,8	22,1 6,4	22,7 9,1
JEV	32 38,5	31,7 25,7	30,2 25,9	30,5 24,6	36,4 36,7	36,4 31,2	29,1 18,9	30,6 22,1	38,4 35	27,9 18,7	30,8 23,8
USUV	35 38,5	31,7 25,7	31,8 30	31,5 24,6	36,4 37,6	33,1 30,4	29,2 18,9	29,3 22	37 35	26,8 18,6	30,7 23,8

Tabla 19. Diferencias genómicas entre los diferentes grupos de WNV, JEV y USUV en la zona codificante del genoma. Se ha llevado a cabo el análisis tanto a nivel de aminoácidos como de nucleótidos. Los resultados de la izquierda en cada celda se corresponden a porcentaje en nucleótidos y los de la derecha a aminoácidos.

5 ANÁLISIS MOLECULAR DEL VIRUS WEST NILE (HU2925/06) ESPAÑOL

5.1 Amplificación del genoma

Se utilizaron algunos de los cebadores diseñados en el apartado 8.1 de Materiales y métodos, diseñados para amplificar el genoma completo de nuevos linajes de WNV. La estrategia a seguir vino marcada por la escasez de material disponible, por lo que los esfuerzos se centraron en la secuenciación de productos de amplificación previamente obtenidos, tal como se esquematiza en la Figura 33. Los productos obtenidos de las dos RT-PCR genéricas de los apartados 3.1 y 6.1 de Materiales y métodos son solapantes, y de un tamaño de 1.035 (RT-PCR Flavi1 para detección) y 1105pb (RT-PCR 1NS5 para filogenia) respectivamente, pudiéndose por tanto obtener la secuencia de un fragmento total de 2.140pb que es casi la totalidad del gen NS5. Del producto de RT-PCR Flavi1 se realizaron dos Nested-PCR, una con las parejas de cebadores KJ17 y la otra con los KJ18, y de la RT-PCR 1NS5 se utilizaron los KJ19 y el cebador KJ20+ junto con el 2NS5Re, ambos se rediseñaron para mejorar la amplificación. El fragmento final que pudo secuenciarse y analizarse resultó ser de 1.813 pb de longitud.

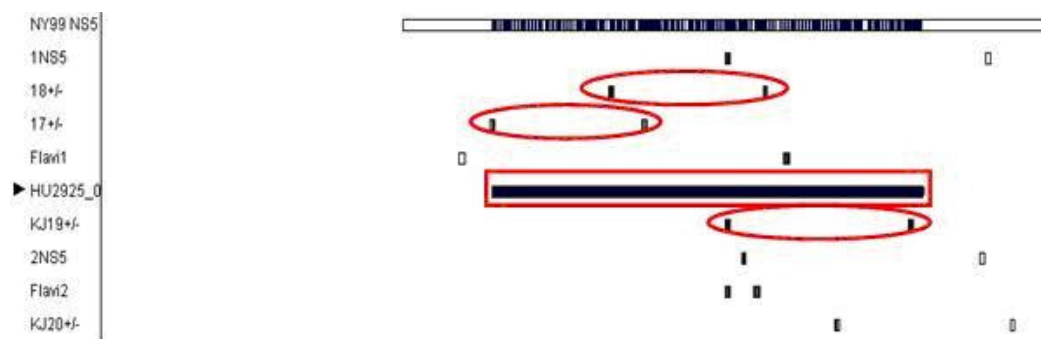


Figura 33. Estrategia de secuenciación para la amplificación de 1.813 pb del gen NS5 del WNV español. El recuadro rojo representa el fragmento total secuenciado. Las elipses rojas muestran los fragmentos parciales y los círculos azules representan los productos correspondientes a 1NS5 y Flavi1 de los cuales se ha partido para llevar a cabo las amplificaciones.

5.2 Análisis filogenético

Para analizar la posibilidad de que HU2925/06 y KJ502/66 pertenecieran o no a la misma rama evolutiva, se analizó la homología de los 1.813 pb que pudieron amplificarse para la muestra HU2925/06 con los correspondientes en la cepa KJ502/66. El análisis filogenético mostró un árbol con una topología en la que como era previsible, tanto HU2925/06 como KJ502/66 quedan incluidos en la rama de los WNV, con un valor de certidumbre del 100 % (Figura 34).

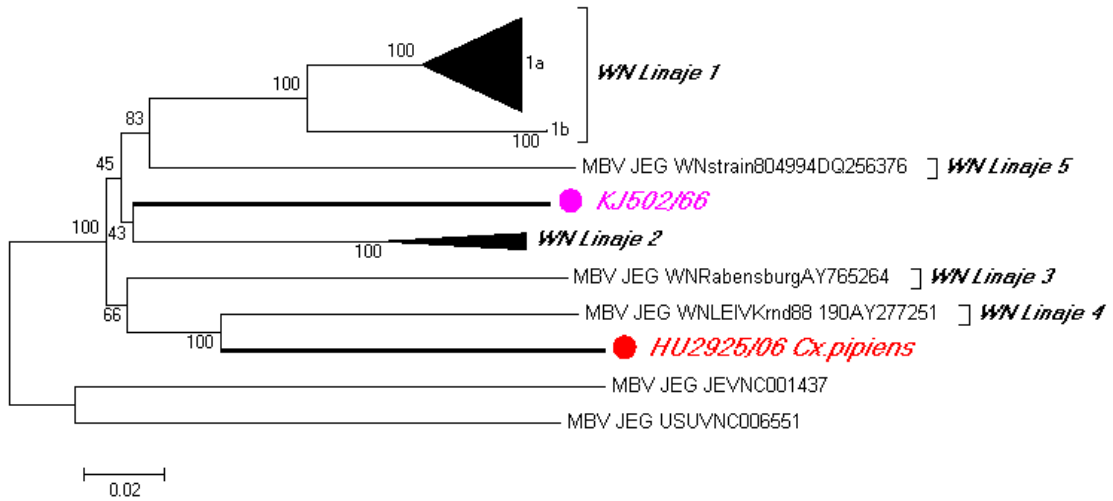


Figura 34. Árbol filogenético de 1.813 pb del gen NS5 de WNV incluyendo el encontrado en España. Árbol realizado en Mega 3.1 en nucleótidos con el método Neighbor-Joining, modelo distancia-p y valor de 1000 bootstrap. Se destacan los diferentes linajes con valores de certidumbre significativos para cada uno de ellos. Los virus JEV y USUV se usaron como raíz.

El análisis estadístico de los árboles obtenidos define una rama evolutiva común para HU2925/06 y el linaje 4 (valor de certidumbre del 100 %). Estos dos, a su vez, parecen estar relacionados con el linaje 3, aunque en esta ocasión con un valor estadístico de certidumbre menor. Estos últimos linajes se han detectado recientemente en Europa (1997 y 1998, respectivamente) y no se han asociado a enfermedad en vertebrados (Tabla 20).

LINAJES	Distribución Geográfica	Vectores	Enfermedad en humanos	Enfermedad en animales
1	África, Europa, Asia y América	<i>Culex sp., Aedes sp., Anopheles sp., Argas hermanni, Hyalomma sp.</i>	Fiebre, afectación del SNC, hepatitis, etc. Brotes	Equinos y aves. Fiebre, SNC y brotes.
2	África, Europa	<i>Culex sp., Aedes sp. y garrapatas</i>	Fiebre, casos esporádicos en SNC, hepatitis. Pequeños brotes.	Aves. Enfermedad media y esporádica afectación del SNC.
3	Europa (República Checa)	<i>Cx. pipiens</i>	Desconocido	Desconocido
4	Europa (Rusia)	<i>Dermacentor marginatus</i>	Desconocido	Desconocido
5	India	<i>Culex sp., Anopheles sp., murciélagos</i>	Fiebre, SNC.	Desconocido
KJ502/66	Asia	<i>Cx.pseudovishnui</i>	Desconocido	Desconocido
HU2925/06	España	<i>Cx. pipiens</i>	Desconocido	Desconocido

Tabla 20. Resumen de las principales características de los diferentes linajes del WNV. En la tabla se muestran la distribución geográfica, vectores y aspectos relacionados con la enfermedad producida en humanos y animales.

El análisis de las distancias en nucleótidos y aminoácidos, confirma que HU2925/06 presenta la menor distancia con el linaje 4 y la mayor con el linaje 5 (Tabla 21), confirmando la topología del árbol filogenético previamente obtenido (Figura 34). Las distancias en aminoácidos indican cómo la distancia presente entre la cepa HU2925/06 y el linaje 4 es mayor (5%) que la observada entre los dos subtipos del linaje 1 (1,1%), lo que nos indica que posiblemente pertenezcan a linajes diferentes.

LINAJES	1a	1b	2	3	4	5	KJ502/66	HU2925/06	JEV	Usutu
1a	-	1.1	5	6.7	7.8	6	5.2	8.3	17.8	16.5
1b	11.1	-	4.8	6.8	7.6	6	4.8	8.1	17.9	16.7
2	20	21.4	-	5.5	6.1	6.7	3.9	7.7	18.5	17.6
3	21.6	22	20.8	-	6.8	7.8	6.6	8.6	18.1	18.1
4	21.8	22	22	22.6	-	9.5	6.8	5	19.6	19.1
5	19.6	20.2	21.3	22.3	23.4	-	6.6	10.9	18.4	17.1
KJ502/66	20.4	20.5	20.2	22.6	22.4	22.1	-	8.5	17.9	16.9
HU2925/06	22.5	22.4	22.2	22	18.3	23.4	23.3	-	19.1	19.2
JEV	27.3	28.2	27.1	26.9	29	27.7	28.1	28	-	14.3
Usutu	26.1	26.8	27.8	29.1	28.1	27.6	26.6	28.2	25	-

Tabla 21. Diferencias genómicas entre los diferentes grupos de WNV, JEV y USUV en 1.813 pb del gen NS5. Los resultados de la parte inferior/izquierda corresponden a porcentaje en nucleótidos y los de la superior/derecha a aminoácidos.

Al analizar más en profundidad genéticamente esta zona, y tomando como secuencia de referencia la secuencia parcial del gen NS5 AF196835, observamos que el fragmento secuenciado en este estudio, conserva ocho residuos de cisteína que también se encuentran conservados en el resto de WNV (posiciones aminoacídicas 145, 180, 185, 396, 449, 452, 670 y 714) y además está presente el motivo de la replicasa viral ⁶⁶⁷GDD₆₆₉. También podemos observar que esta secuencia posee cuatro sitios de glicosilación: dos de ellos presentes en todos los linajes del virus (²¹⁴NST₂₁₆, ³⁷⁷NET₃₇₉), otro perdido para el linaje 4 y la cepa KJ502/66 (²³⁴NMT₂₃₆→SMT) y otro presente únicamente en esta cepa encontrada en España (⁵⁰³NNS₅₀₅). Por último se puede destacar la presencia de siete sustituciones aminoacídicas en esta secuencia que no están presentes en el resto de los linajes del virus ni en la cepa KJ502/666 analizada también en esta tesis doctoral (¹⁵²S→A, ³⁶⁹P→E, ³⁹⁹E→G, ⁵⁰³E,K→N, ⁶³⁸E→G, ⁶⁴⁶P→T, ⁶⁶¹S,G→R).

6 AISLAMIENTO VÍRICO

6.1 Cultivos celulares

6.1.1 Virus de mosquitos

Para comprobar la capacidad de replicar en células de mosquito (C6/36) o de vertebrados (Vero E6), se escogieron cuatro lotes de mosquitos, tres de ellos del grupo 1 (HU2100/05, HU2125/05, HU2131/05) de los virus agrupados con los virus de insecto y el último del grupo 9 (HU2051/05) de la rama de los MBV. Se infectaron frascos de 25 cm² de superficie con 100 µl de la muestra homogeneizada como se especifica en el apartado 11.1 de Materiales y métodos. Se realizaron tres pases en cultivos celulares de C6/36 y Vero E6 y de cada pase se hizo RT-Nested-PCR del sobrenadante del cultivo para detectar la posible presencia de genoma viral. Los resultados se esquematizan en la tabla 22.

	HU2051/05 <i>Oc. caspius</i> Los Álamos		HU2100/05 <i>Cx. theileri</i> Celestino Mutis		HU2125/05 <i>Cx. theileri</i> Palacio Doñana		HU2131/05 <i>Cx. theileri</i> Palacio Doñana	
	C6/36	Vero E6	C6/36	Vero E6	C6/36	Vero E6	C6/36	Vero E6
Pase1	+ débil	-	+	+ débil	+	+ débil	+	+ débil
Pase2	-	-	+ ECP	-	+	-	+	-
Pase3	-	-	+ ECP	-	+ ECP	-	+ ECP	-

Tabla 22. Datos de los cultivos en células C6/36 y Vero E6 de algunos flavivirus de los mosquitos españoles. Los símbolos + o - se refieren a si hubo amplificación o no con la RT-Nested-PCR de detección para flavivirus. Las siglas ECP indican la aparición de efecto citopático en el cultivo.

En el caso de los virus del grupo 1 se detectó amplificación en las células de mosquito C6/36 y un posible ECP que consistió en la formación de pequeños agrupamientos celulares dejando huecos grandes sin células en la monocapa, sin embargo no hubo replicación viral en las células de vertebrado Vero E6. El virus del grupo 9 no consiguió replicarse ni en las células de mosquito ni en las de vertebrado, aunque en el primer pase en C6/36 se detectó una pequeña amplificación.

6.1.2 Virus KJ502/66

Se infectó un frasco de 25 cm² de células Vero E6 con 50 µl del virus KJ502/66 para conseguir un stock viral. El virus creció rápidamente dando un claro ECP al quinto día post-infección. El cultivo viral se recogió al séptimo día. A partir de este stock se hicieron las extracciones para amplificar el genoma completo del virus.

6.1.3 Virus West Nile (HU2925/06) español

Se utilizaron tres líneas celulares: Vero E6, C6/36 y RK13. Para hacer todas las inoculaciones se preparó un inóculo consistente en 120 µl de la muestra homogeneizada diluida en 2.280 µl (dilución 1/20) de EMEM. El medio de cultivo a utilizar fue EMEM suplementado al 5 % con SFB, antibióticos y aa-NE. A las células Vero E6 se las añadió un aporte de 1 % de piruvato y a las C6/36 un 1 % de vitaminas y 1 % de piruvato.

A) Vero E6 y RK13

Se inocularon placas de cultivo celular de 24 pocillos de 2 cm² de superficie para cada pocillo por cada línea celular, utilizando sólo ocho pocillos, cuatro inoculados con 200 µl de la dilución 1/20 de la muestra y otros cuatro de control de células sin infectar. Aunque no se observó ECP al séptimo día post-infección (dpi) en ninguna línea celular, se realizó en este día la RT-Nested-PCR de detección para flavivirus, para comprobar la existencia o no de presencia de genoma viral antes de realizar el siguiente pase celular. En ninguno de los tres pases celulares que se realizaron en ciego se observó ECP y tampoco hubo amplificación viral.

B) C6/36

Se inocularon dos frascos de 12,5 cm² de superficie (M1 y M2) con 400 µl de la dilución 1/20 y se dejó uno de control de células sin infectar. A los tres días en los M1 y M2 se observó que el 50 % de la monocapa celular estaba levantada, mientras que el control de células no infectadas estaba en perfecto estado. Al cuarto dpi el 70 % de la monocapa estaba levantada también en M1 y M2 y el control de células se mantenía bien conservado; entonces se realizó un segundo pase. Por un lado se inoculó un frasco de 12,5 cm² de C6/36 con 100 µl del sobrenadante celular del M1 y otros 100 µl del M2. Y además se inoculó un frasco de 25 cm² de células Vero E6 con 500 µl del sobrenadante celular del M1 y otros 500 µl del M2. En las C6/36 al segundo día se empezó a levantar la monocapa y al tercer día se recogió y se congeló a -80 °C, estando el control de células en perfecto estado. No se detectó genoma de flavivirus por métodos moleculares. En el frasco de las células Vero E6 se observó al sexto día que las células se empezaron a despegar, y que no ocurría en el control de células. Al séptimo día se hizo un tercer pase inoculando con 1 ml de este sobrenadante celular a otro frasco de 25 cm² de células Vero E6, resultando ser la amplificación de flavivirus también negativa. Al sexto día de este tercer pase se empezó a observar levantamiento celular por los bordes y al séptimo día se recogió y congeló siendo también negativa la amplificación (Figura 35).

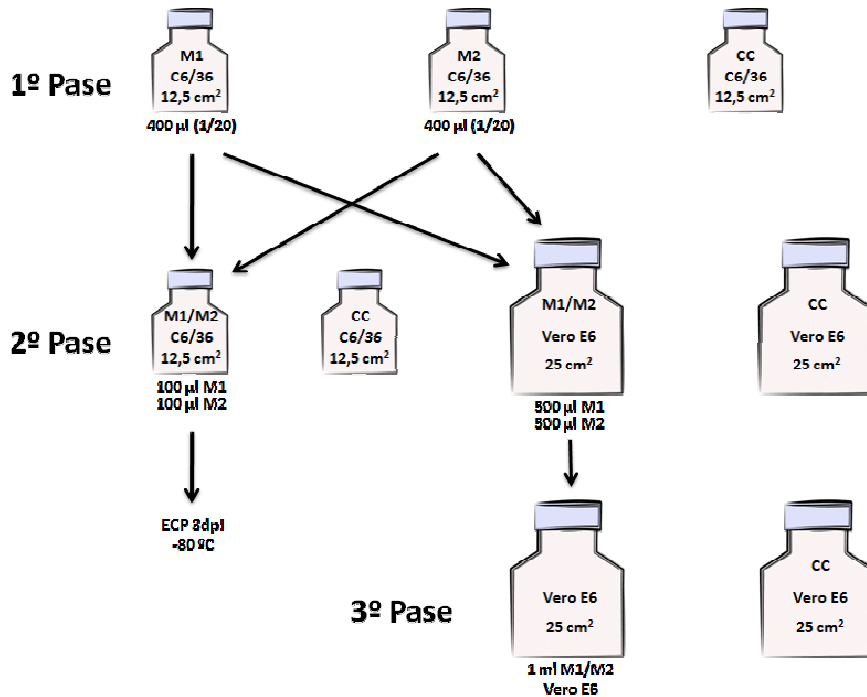


Figura 35. Esquema de los cultivos virales de WNV (HU2925/06) encontrado en España. Se muestra la cantidad con la que se infectan los cultivos celulares, el tipo de células fijadas en la monocapa, el tamaño del frasco y la abreviatura CC se corresponde a control de células.

Dado que el claro ECP observado en células C6/36 no parecía deberse a la presencia de ningún flavivirus, se decidió visualizar la posible presencia de partículas virales mediante microscopía electrónica (apartado 12 de Materiales y métodos). Para ello se inoculó un frasco de 12,5 cm² de C6/36 con 500 µl del sobrenadante que se tenía congelado del frasco M1 del primer pase de las C6/36. Se hallaron partículas virales tanto en el sobrenadante del cultivo como en el interior de las células (Figura 36). Por su tamaño (de 50 a 60 nm de diámetro) y morfología son compatibles con partículas de la familia *Flaviviridae* (50) o *Togaviridae* (60), por lo que podía ser un virus perteneciente a los géneros *Flavivirus*, *Pestivirus* o *Alphavirus* (Strauss y Strauss, 2002, Calisher y Gould, 2003). Así, todos los extractos, se ensayaron con PCRs genéricas disponibles en el laboratorio para alphavirus y pestivirus (como peste porcina clásica o diarrea bovina, para descartar posibles contaminaciones). Todas estas PCRs fueron negativas.

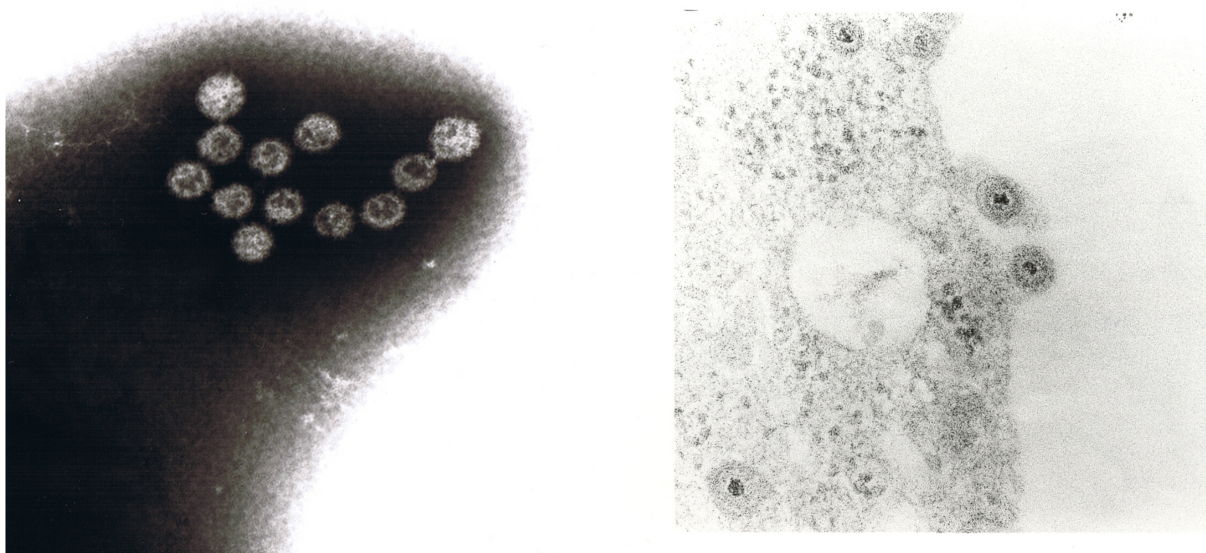


Figura 36. Imágenes tomadas por M.E. de la muestra obtenida de C6/36. Micrografías obtenidas por tinción negativa de los cultivos celulares infectados con la muestra. En la figura de la izquierda se ha empleado la tinción directa de la muestra y en la de la derecha la tinción de un corte en el que se observa el proceso de salida del virión al medio extracelular. (Cedida por el Servicio de Microscopía Electrónica del CNM).

6.2 Inoculación en modelos animales

6.2.1 Embriones de pollo

La técnica se llevó a cabo como se especifica en el apartado 11.2.1 de Materiales y métodos. En algún caso, tras abrir el huevo y observar el líquido alantoideo (LA) se encontraron embriones muertos debido a contaminaciones bacterianas. En tres ocasiones se encontraron embriones muertos con hemorragias compatibles con una infección por WNV, pero al hacer la PCR genérica de detección para flavivirus no se detectó genoma viral. Así, a todos los embriones del experimento se les analizó el LA, y resultaron ser todos negativos. El LA analizado por M.E., no demostró contener ninguna partícula viral.

6.2.2 Ratones lactantes

La técnica se llevó a cabo como se especifica en el apartado 11.2.2 de Materiales y métodos. Tras siete días de observación, no se detectaron síntomas de infección por WNV en ninguno de los ratones inoculados y no se registró ninguna muerte en la camada. Tras la recogida y procesamiento de los cerebros de los ratones, se hizo una extracción del material genético de la muestra y no se detectó genoma viral de flavivirus en ninguna de las muestras.

7 DESARROLLO DE UNA PCR EN TIEMPO REAL PARA WEST NILE

7.1 Obtención de diferentes linajes de WNV y del control interno

Para los linajes 4 y 5 se obtuvieron varios clones con genomas quiméricos que fueron secuenciados para asegurarnos de la ausencia de mutaciones respecto a la secuencia genómica disponible en las bases de datos (apartado 10 de Materiales y métodos). Así mismo se construyó un control interno (CI), consistente en un ADN sintético con las secuencias de los cebadores específicos de WNV y una secuencia exógena con la diana de una sonda.

Las muestras correspondientes a los linajes 1, 2, 3 y MP502/66, se amplificaron en una PCR convencional utilizando los cebadores de la PCR en tiempo real. El fragmento amplificado se purificó y clonó en plásmidos recombinantes (apartado 9 de Materiales y métodos) y se secuenciaron los clones obtenidos. Se eligió un clon de cada muestra que no tuviese mutaciones en su secuencia para llevar a cabo la optimización de la PCR en tiempo real, se cuantificó y se hicieron diluciones de tal manera que se contabilizasen en n° de copias/reacción.

7.2 Optimización del control interno

Se llevó a cabo siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 10.2 de Materiales y métodos, y se llegó a una detección límite de 10 copias/reacción (Figura 37). Por analogía con métodos análogos previamente diseñados en el laboratorio, se decidió usar como control interno para las reacciones de amplificación viral una cantidad equivalente a 20 veces el límite de detección, es decir 200 copias CI/reacción.

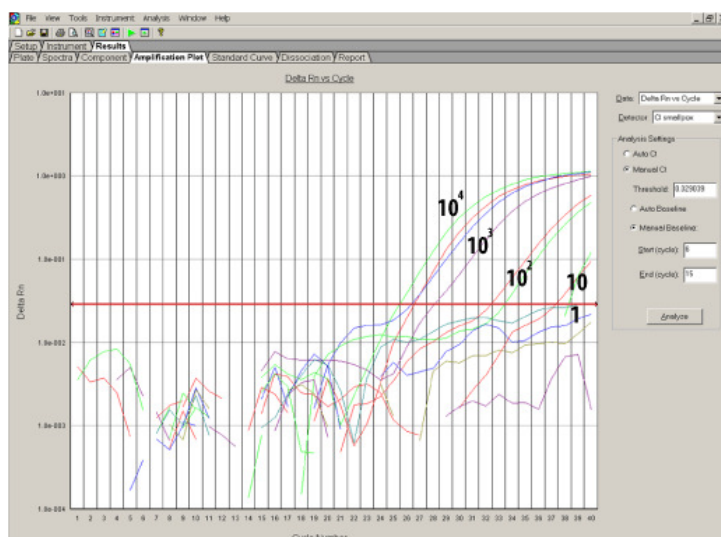


Figura 37. Sensibilidad en la detección del control interno mediante la PCR en tiempo real.

7.3 Optimización de la PCR en tiempo real

Esta se llevó a cabo inicialmente con el linaje 1 de WNV. Las condiciones finales de reacción fueron las siguientes:

Reactivo	Volumen
Agua estéril	17.2 μ l
Tampón 2x (Applied-Biosystem)	25 μ l
Cebador WNRT-F (100pmol)	0.4 μ l
Cebador WNRT-Re (100pmol)	0.4 μ l
Sonda WN (5 μ M)	4 μ l
Sonda CI (5 μ M)	2 μ l
CI 10^4	1 μ l

Se añadieron a cada tubo 45 μ l de la mezcla y se cargaron con 5 μ l de la muestra. La reacción se inició con una desnaturalización inicial y activación de la polimerasa de 10 minutos a 95 $^{\circ}$ C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 $^{\circ}$ C y 1 minuto a 60 $^{\circ}$ C.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para el linaje 1, se hizo una prueba con los linajes del 1 al 5 y con la cepa MP502/66. Para cada una de las seis muestras (linajes 1 a 5 y KJ502/66) se llegó a un límite de detección aproximado de 1 copia/reacción (Figura 38).

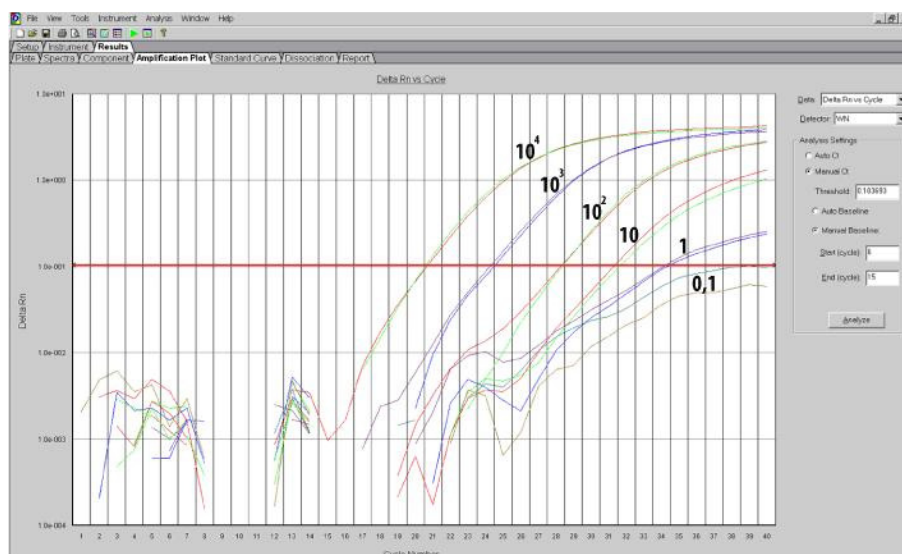


Figura 38. Prueba de sensibilidad para el linaje 1 de WNV. Para todos los linajes (1 a 4) de WNV y la muestra KJ502/66 se llega al límite de detección de 1 copia/reacción.

Para realizar un cálculo más aproximado de la sensibilidad, se utilizó el método de *Reed-Muench* (adaptado a logaritmos en base 4) descrito en el apartado 10.3 de Materiales y métodos. En el ensayo se probaron por cuadruplicado las concentraciones de 16, 4, 1, 1/4 y 1/16 copias/reacción para los linajes 1, 2 y 3. La dilución de 4 copias/reacción se detectó en los tres linajes (100% de los casos) y 1 copia/reacción en 1 tubo del linaje 2 y en otro del 3, por lo tanto se detectó en dos tubos de 12 (16%).

4 copias/reacción es donde se detectó el 100% de los casos y esto se corresponde a 4^1 , por lo que la fórmula adaptada en logaritmo en base 4 del método quedaría: $4^{1-EGD_{50}}$

$$EGD_{50}: \frac{100 - 50}{100 - 16} = 0,59 \quad 4^{1-0,59} = 4^{0,41} = 1,77 \text{ copias/reacción}$$

Por lo que el resultado del cálculo de la sensibilidad aproximada de la técnica, se correspondió a 1,77 copias/reacción (Figura 39).

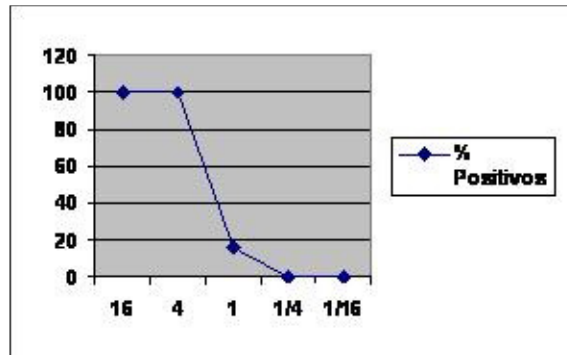


Figura 39. Representación de la curva de sensibilidad de la PCR en tiempo real. En el eje de las abscisas se muestra el porcentaje de positividad y en el de las ordenadas se muestran las concentraciones (nº copias/reacción) ensayadas para las muestras.

En este mismo ensayo se probó la detección de la muestra HU2925/06 española. Para ello se obtuvo ADNc a partir del ARN de la muestra y se ensayaron por duplicado las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} del ADNc obtenido. La dilución 10^{-3} no se detectó en ninguno de los dos tubos. Se consiguió sólo un resultado positivo para la dilución 10^{-2} , y hubo señal en ambos tubos al utilizar la 10^{-1} (Figura 40).

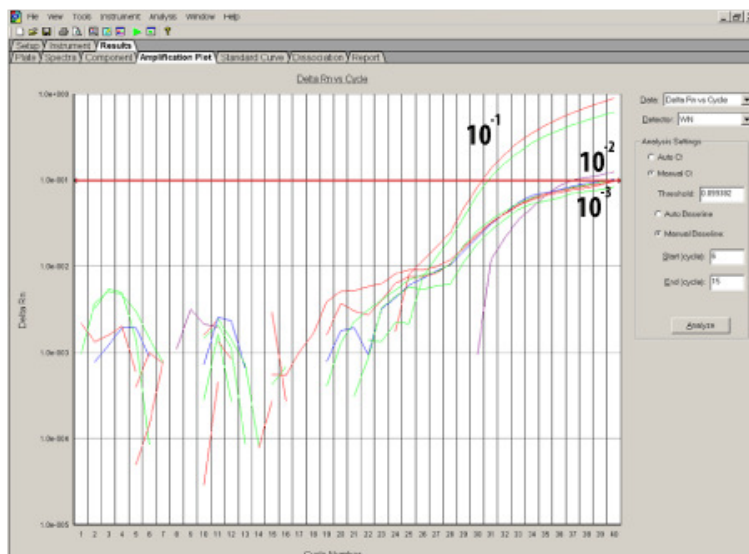


Figura 40. Límite de detección de la muestra HU2925/06 con la PCR en tiempo real.

Discusión

Teniendo en cuenta la importancia de los flavivirus en salud humana, la gran actividad y expansión de WNV en los últimos años y los antecedentes serológicos que evidencian la presencia de estos virus en nuestro país, esta tesis doctoral se ha basado en el estudio de la presencia de flavivirus en España, en su análisis molecular y filogenético y en el desarrollo de nuevas metodologías para su diagnóstico.

1 FLAVIVIRUS DETECTADOS EN CULÍCIDOS Y FLEBOTOMOS

En España, las investigaciones realizadas sobre flavivirus se han basado fundamentalmente en métodos serológicos sobre muestras humanas y animales. Esta es la primera vez que se ha llevado a cabo un estudio molecular buscando genoma de flavivirus en los potenciales vectores en nuestro país, por lo que en primer lugar, se propuso la búsqueda de flavivirus con métodos moleculares genéricos en mosquitos y flebotomos. Para este fin, se utilizó una RT-PCR genérica de detección (Sánchez-Seco, 2005) que se aplicó a las muestras de vectores. Las muestras fueron obtenidas de diferentes humedales españoles, mediante la colaboración con diversos grupos de entomología, en un abordaje multidisciplinar en el ámbito de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Enfermedades Víricas Transmitidas por Artrópodos y Roedores (EVITAR).

Resulta sorprendente la diversidad de culícidos en la que se han encontrado flavivirus (Tabla 11), un hecho que podría estar asociado a su diversidad evolutiva y a su amplia distribución global. Para realizar una identificación y caracterización de los virus detectados se desarrolló y se puso a punto una RT-PCR genérica, muy útil para realizar estudios filogenéticos de este género viral y que nos permitió diferenciar dos grandes grupos de flavivirus en nuestros resultados. El mayoritario se encuentra en la rama de los virus propios de insecto y otros flavivirus se agrupan con los MBV (Figura 24).

La mayor circulación de mosquitos y flebotomos en nuestro medio se produce en los meses cálidos. Si además se dan las condiciones óptimas (presencia de aves infectadas y actividad del hombre al aire libre, entre otros factores) obviamente es en estos períodos cuando más riesgo de infección por flavivirus existe. Nuestros resultados se ajustan a esto ya que la mayoría de los lotes positivos (4,7% del total), fueron

capturados entre los meses de mayo y septiembre (dependiendo del año analizado), aunque varía desde febrero hasta diciembre (Figura 41).

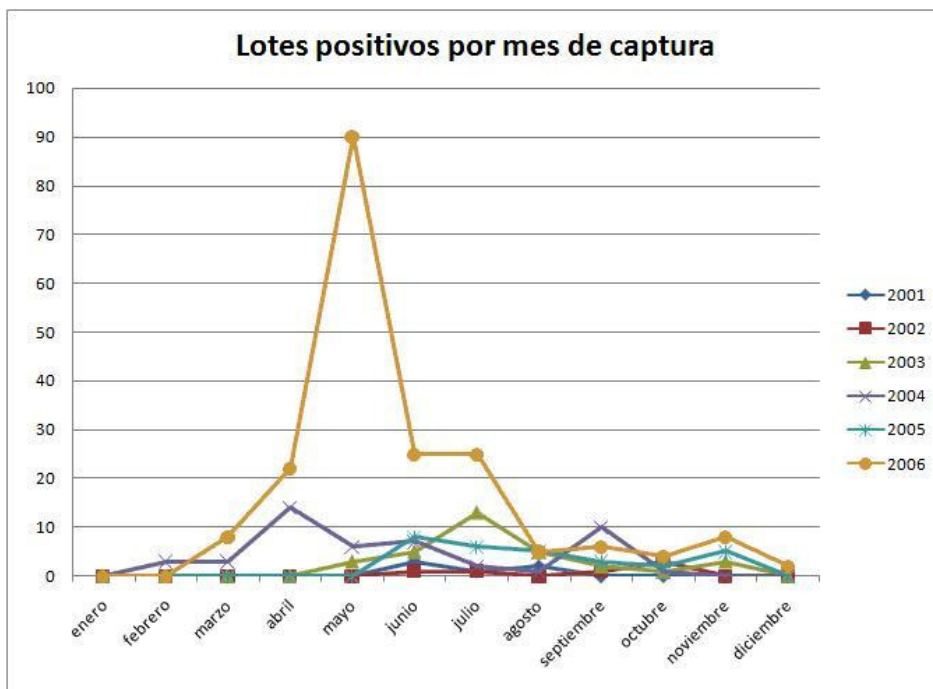


Figura 41. Representación de los lotes positivos para flavivirus por meses y años de captura.

De los resultados obtenidos podemos resaltar que las especies más abundantes de mosquitos capturadas, han sido *Oc. caspius* y *Cx. pipiens*, las cuales producen las principales plagas de mosquitos en España (Eritja y cols., 2000). También cabe destacar que las especies con mayor número de lotes positivos encontradas fueron *Cx. theileri* y *Oc. caspius*. Andalucía fue la región con mayor número de insectos y especies capturadas, y con mayor número de lotes positivos, aunque esta diferencia puede ser atribuida a que la metodología utilizada no es la misma en todos los humedales.

1.1 Flavivirus propios de insecto

Como ya se ha comentado en el apartado 1.1 de Resultados, ocho de los 10 grupos obtenidos en este trabajo, se han relacionado con los flavivirus propios de insecto (grupos del 1 al 8) (Figura 22). Los resultados obtenidos parecen indicar una asociación de las secuencias al vector en el que se han encontrado.

Un análisis filogenético realizado sobre un fragmento grande del gen NS5 (RT-PCR de filogenia desarrollada en esta tesis doctoral), que ha sido utilizado por otros autores en la mayor parte de los estudios de filogenia llevados a cabo hasta la fecha para este género viral, confirmó en líneas generales los resultados obtenidos previamente con la RT-PCR de detección y con unos altos valores de certidumbre (Figura 24). Con esta

nueva metodología no se consiguió amplificar cuatro de los 10 grupos descritos con la metodología anterior, los cuales se correspondieron: a los grupos 4 y 5 que están formados por secuencias detectadas en flebotomos de Barcelona, al grupo 7 formado por secuencias detectadas principalmente en *Ae. vexans* de Gerona y al grupo 2 formado por dos secuencias detectadas en *Culex* de Huelva. La nueva técnica también utiliza cebadores degenerados, para permitir la amplificación de todos los virus previamente conocidos pertenecientes al género *Flavivirus*. La ausencia de amplificación en los grupos 4 y 5 podría deberse a una divergencia evolutiva en estos virus para adaptarse a este vector, que haya conducido a cambios en las secuencias de aminoácidos seleccionadas (y por tanto de nucleótidos) para diseñar los iniciadores de reacción degenerados. Las posibles explicaciones a los resultados negativos en los ensayos de amplificación genómica con esta técnica en el caso de los grupos 2 y 7, se discutirán más adelante.

Los resultados obtenidos con esta nueva técnica, confirmaron la asociación de los diferentes grupos de secuencias detectadas al vector del cual se han obtenido. Estos datos apoyan la hipótesis de una posible co-evolución del virus y vector, en los que KRV y CFAV (trasmitidos por *Aedes*) se agrupan en la misma rama y CxFV (transmitidos por *Culex*) en otra rama próxima (Hoshino y cols., 2007). Otra ventaja que aporta esta técnica es la capacidad de poder diferenciar subgrupos, que en nuestro estudio se visualizan en el grupo 3 según las diversas regiones geográficas donde se capturaron esos insectos (Figura 42), no apreciándose en el grupo 1 al ser todos los lotes de la misma zona.

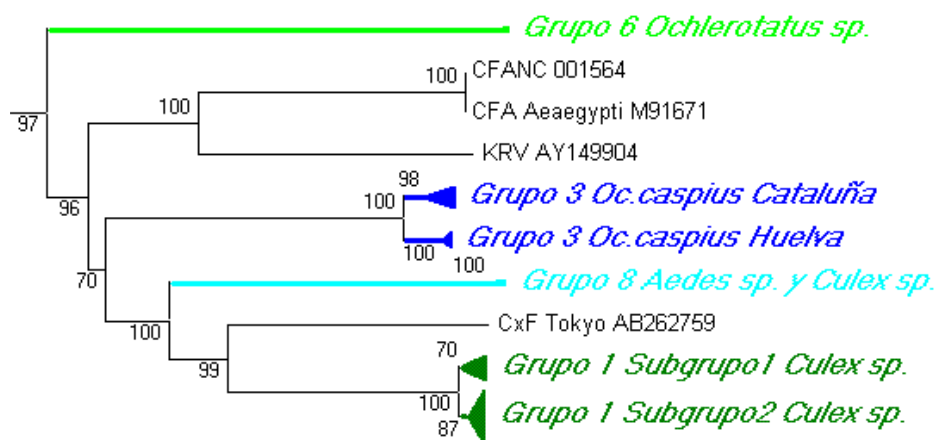


Figura 42. Representación filogenética de los flavivirus propios de insecto junto con los obtenidos en este trabajo. Pueden observarse los altos valores de certidumbre que dan robustez a los datos y la asociación de las secuencias amplificadas al vector en el que se han detectado.

Además, los resultados de este análisis, mostraron cómo los grupos 1, 3, 6 y 8 junto con los virus CFAV, KRV y CxFV, definen una rama evolutiva marcadamente diferente a los flavivirus con capacidad de replicación en células de vertebrado (MBV, TBV y UNKV)(Figura 24). Observando en detalle la topología del árbol filogenético obtenido para este grupo de flavivirus propios de insecto, se apreció que los grupos 1 y 8, detectados en *Culex*, eran muy próximos a los virus de insecto descritos para *Culex*

(CxFV) en Asia. Mientras que los grupos 3 y 6 detectados en *Ochlerotatus* (perteneciente al género *Aedes*) y los previamente asociados a *Aedes* (CFAV y KRV), quedan dispersos en diferentes grupos que parecen tener un origen evolutivo anterior a los virus que conforman la rama de los flavivirus asociados a *Culex* (Figura 41).

Las distancias observadas a nivel de aminoácidos entre los flavivirus propios de insecto previamente conocidos, y los obtenidos en nuestro trabajo, mostraron grandes diferencias, excepto para el grupo 1 que presentó una distancia con respecto a CxFV de 13,8%, muy parecida a la existente entre CFAV y KRV (Tabla 15). El grupo 8 mostró unas diferencias con respecto al grupo 1 y CxFV del 26,1 % y 28,8 % respectivamente, confirmando su relación filogenética. Tal como se observó en la topología del árbol, la magnitud de las distancias, confirmó que se trata de nuevos grupos de virus.

Es importante destacar que es la primera vez que se describe la presencia de flavivirus de insecto en especies como *Ae. vexans*, *Oc. caspius*, *Anopheles atroparvus*, *Culiseta* sp. y la primera vez que se detectan flavivirus en flebotomos fuera del continente africano (Fontenille y cols., 1994). Este último hallazgo es importante, ya que como se ha demostrado para otros virus como Toscana y parásitos como *Leishmania*, los flebotomos pueden ser importantes vectores de transmisión de diferentes enfermedades. Además aumentaría el número de especies de insectos que pueden actuar como vectores para este género viral. Las características diferenciales de los flebotomos hacen que este dato sea de gran interés, ya que estos insectos podrían representar un nuevo vector para la transmisión de enfermedades por flavivirus. Además, su estudio adicional probablemente ayudará a comprender mejor la evolución y orígenes de estos virus.

Los recientes hallazgos de nuevas cepas de CFAV (Cook y cols., 2006), de nuevos virus propios de insecto en mosquitos del género *Culex* (Hoshino y cols., 2007) y los genomas de flavivirus encontrados integrados en el genoma de mosquitos (Crochu y cols., 2004), sugerían que más miembros de este grupo de flavivirus, podrían estar presentes en la naturaleza, algo que los resultados obtenidos en esta tesis doctoral confirman, ya que 303 de los 311 (97,4 %) lotes positivos presentaron nuevas secuencias relacionadas a los flavivirus propios de insecto. Además hemos encontrado en algunas muestras del grupo 1, mosquitos de *Cx. pipiens* y *Cx. theileri* de ambos sexos infectados, lo que sugiere una posible transmisión vertical del virus, característica ya descrita para este género viral (Nasci y cols., 2001, Goddard y cols., 2003, Kuno y Chang, 2005, Anderson y Main, 2006) o una posible transmisión sexual. El hallazgo en la naturaleza de estos flavivirus apunta hacia una transmisión transovárica, pero para determinar fehacientemente el modo de transmisión se requiere la realización de estudios adicionales.

Para comprobar si se había amplificado genoma viral o una parte del genoma del virus integrado en el del vector, se realizaron **digestiones enzimáticas para degradar el ARN**, modificando además las condiciones de amplificación para evitar la obtención de ADNc a partir de ARN viral y que, por tanto, sólo observáramos amplificación genómica en el caso de que el genoma viral estuviese en forma de ADN, integrado en el genoma del mosquito. En los lotes de los grupos 1, 3, 4, 5 y 9 analizados, la amplificación mostró ser totalmente dependiente de ARN lo cual sugería que la secuencia amplificada era producto de la infección por un virus. Sin embargo, la prueba inequívoca de que, al menos en

algunos casos estábamos ante la presencia de virus, fue que en algunos de estos lotes del grupo 1, se aisló virus en cultivo celular de células C6/36, donde el virus produjo efecto citopático tras cuatro pases celulares y se observó amplificación por RT-PCR. Por el contrario, para los grupos 2, 6, 7 y 8, la amplificación mostró ser dependiente de ADN, lo que sugería una integración del genoma del virus en el del mosquito (Tablas 17 y 24). No se han realizado aún intentos de cultivo celular de estas muestras, para confirmar que efectivamente no existe replicación viral, aunque futuros trabajos se encaminarán a este fin, al igual que para descubrir exactamente el fragmento completo del genoma que ha sido integrado.

GRUPO	ESPECIES DE INSECTOS	ARN/ADN	DISTRIBUCIÓN
Grupo 1	<i>Culex sp.</i>	ARN	HU 2002-2006
Grupo 2	<i>Culex sp.</i>	ADN	HU 2002, 2006
Grupo 3	<i>Oc. caspius</i>	ARN	HU 2004, 2006 B 2002, 2005 T 2002-2005 GE 2003-2005
Grupo 4	<i>Flebotomo</i>	ARN	B 2002-2005
Grupo 5	<i>Flebotomo</i>	ARN	B 2005
Grupo 6	<i>Ochlerotatus sp. y Culiseta sp.</i>	ADN	HU 2004, 2006
Grupo 7	<i>Aedes sp.</i>	ADN	GE 2001, 2005
Grupo 8	<i>Aedes sp. Y Culex sp.</i>	ADN codones de terminación	GE 2001, 2003, 2004
Grupo 9	<i>Oc. Caspius</i>	ARN	HU 2003, 2005-2006
Grupo 10	<i>Cx. Pipiens</i>	ARN	HU 2006

Tabla 23. Resumen de los diferentes grupos de flavivirus detectados. En la tabla se muestran los grupos detectados, las especies de insectos en las que se han encontrado, si se corresponden a secuencias de ARN o ADN, su localización geográfica y el año de captura.

Si nos fijamos en detalle en cada uno de estos cuatro grupos en los que ha podido haber integración, observamos cómo el grupo 2 está formado por dos únicas secuencias detectadas en Huelva en dos especies diferentes de mosquitos, en el año 2002 en *Cx. pipiens* y en el año 2006 en *Cx. modestus*. En ninguna de las dos muestras pudo amplificarse el fragmento del gen NS5 utilizado para filogenia, pudiendo deberse a que el fragmento integrado no incluya la zona en la que están diseñados los cebadores de esta RT-Nested-PCR. En el caso de la muestra del 2002 de *Cx. pipiens* (HU186/02), la prueba de la ARNsa no fue válida, probablemente debido a la degradación de los ácidos nucleicos de la muestra. El lote del año 2006 de *Cx. modestus* (HU3005/06) resultó ser ADN, pero no puede compararse con ningún otro porque fue el único lote de *Cx. modestus* positivo de todos los muestreados.

El grupo 6, está formado por seis muestras procedentes del Palacio de Doñana, una de *Cs. annulata* (2004), dos de *Oc. detritus* (2004 y 2006) y tres de *Oc. caspius* (2006). De las muestras obtenidas en el 2004 no hay más positivos en esas especies de mosquitos ni de esa zona, pero de las del 2006, hay más muestras positivas de *Oc.*

caspius de esa misma zona y de fechas muy próximas que pertenecen al grupo 3. Esto nos indica, por una parte que esta secuencia integrada no está en todos los *Oc. caspius* de esa zona, lo que sugiere una integración reciente y, por otra parte, que en la misma zona y tal vez al mismo tiempo estuvieron circulando al menos dos flavivirus propios de insecto distintos (Figura 43). Pero además este grupo nos da más información, ya que podemos observar cómo la misma secuencia está integrada en dos especies de mosquitos diferentes en el año 2004 (*Oc. detritus* y *Cs. annulata*) y en el año 2006 (*Oc. detritus* y en *Oc. caspius*), y en el caso de *Oc. detritus* podría haberse mantenido esta integración en la población de esta especie de mosquito durante dos años consecutivos. Una hipótesis a estudiar sería si esta integración confiriese algún tipo de ventaja evolutiva en determinadas especies de mosquitos, haciendo que la integración perdure, pero que sin embargo en otras especies no sea así. Esta teoría ya se ha postulado en el trabajo de Crochu y cols., que detectaron una secuencia multigénica (genes NS1-NS4A) de los flavivirus, integrada en el genoma de mosquitos *Ae. albopictus* y que era transcrita a ARNm. La expresión de las proteínas virales, podría conferir al mosquito alguna ventaja evolutiva (Crochu y cols., 2004). De igual manera, este fenómeno podría estar dándose en flavivirus de vertebrados, aunque no se ha descrito hasta la fecha. Asimismo, si se detectara alguna integración del genoma viral en una población de una especie de mosquito en concreto que no la presentaran las otras especies de mosquitos de la zona, y si fuese estable y se mantuviese en el tiempo, esto sería muy interesante como marcador biológico poblacional para esa especie, y tendría una gran aplicabilidad en genética de poblaciones en entomología y epidemiología.

Si analizamos el grupo 7 vemos que está formado por 12 secuencias encontradas en mosquitos del género *Aedes*, principalmente en *Ae. vexans* capturados en dos zonas diferentes de Gerona (San Juan y Senillosa) en los años 2001 y 2005. En este caso tampoco fue posible amplificar el fragmento para filogenia de la NS5. Se ha visto genoma integrado en *Ae. vexans* y *Oc. caspius* del año 2005, pero no tenemos información de los lotes del año 2001, lo cual es necesario para estudiar si se trata de una integración reciente, y si está mantenida en el tiempo. Sí sabemos, sin embargo, que en el 2005 y en esa zona, se han detectado además secuencias en *Oc. caspius* del grupo 3, lo que sugiere la co-circulación de al menos dos flavivirus propios de insecto.

En el caso del grupo 8, se ha visto que se amplifica ADN en dos de sus seis muestras, habiéndose obtenido la secuencia en dos de ellas del fragmento para filogenia. En él se puede observar la presencia de codones de terminación, lo que podría indicar que no sea una secuencia funcional, tal como se describió previamente en una secuencia de 492 aminoácidos en *Ae. aegypti* (Crochu y cols., 2004). En este grupo también se observa el hecho de que el mismo genoma está integrado en más de una especie de insecto, lo que sugiere que parte de un virus presente en la naturaleza, se ha transmitido e integrado en diferentes especies. La información aportada por los grupos 7 y 8, indica que en mosquitos *Ae. vexans* de la localidad de San Juan en Gerona, se han producido dos eventos de integración diferentes, uno en el año 2004 (grupo 8) y otro en el año 2005 (grupo 7), y que dichos eventos no perduran, ya que no se observan en las siguientes generaciones de mosquitos.

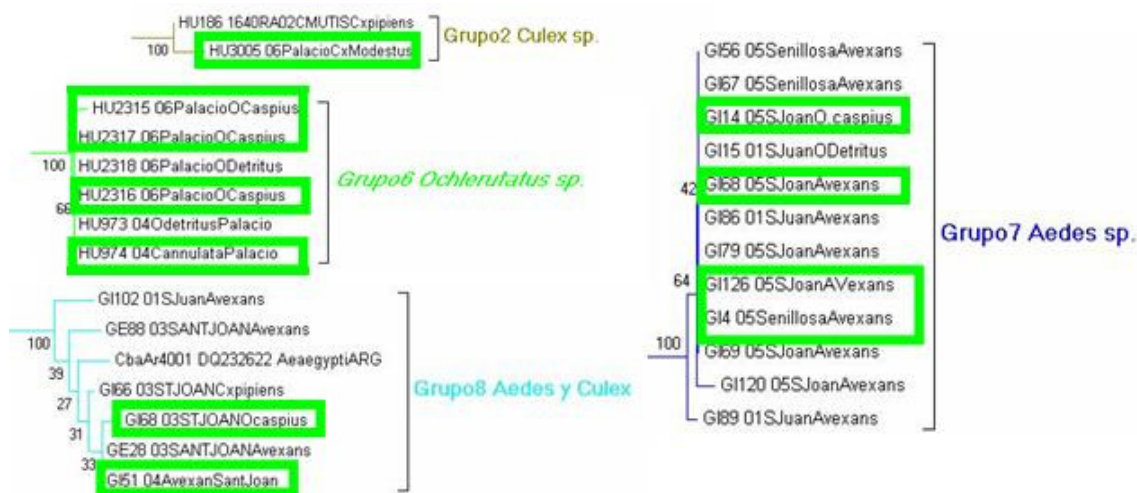


Figura 43. Detalle del árbol obtenido tras el análisis de 87 pb de los grupos de virus de ADN encontrados. Dentro del recuadro verde se resaltan las muestras que tras realizar la prueba de la ARNs ha encontrado ADN. El árbol completo se muestra en la figura 22.

Una posible explicación al fenómeno de la integración del genoma viral en el de la célula infectada, se basa en que tras la infección por el virus, y gracias a una transcriptasa inversa intra-celular (endógena o exógena), exista la capacidad de copiar el ARN viral a ADN antes de su integración en el genoma del hospedador (Zhdanov, 1975, Crochu y cols., 2004). Este fenómeno se ha descrito en otros virus (Sarampión, Sindbis y Linfocoriomeningitis) pertenecientes a diferentes géneros y familias virales (Zhdanov y Parfanovich, 1974, Zhdanov y Azadova, 1976, Gaidamovich y cols., 1978, Klenerman y cols., 1997). Nuestros hallazgos indican que éste puede ser un fenómeno más frecuente de lo supuesto hasta la fecha. Para el género *Flavivirus*, este fenómeno se ha descrito para TBEV en células de ratón infectadas crónicamente (Drynov y cols., 1981) y para flavivirus propios de insecto como CFAV y KRV (Crochu y cols., 2004). Existen varias teorías para explicar el mecanismo de integración, como la coinfección con un retrovirus natural, la acción de un retrovirus endógeno (presente en el genoma de la mayoría de los eucariotas)(Terzian y cols., 2001) o también debido a la acción de retrotransposones. En este sentido, se han identificado regiones con una alta similitud a la región codificante de la proteína de la envuelta G2 de los flebovirus (virus ARN pertenecientes a la familia Bunyaviridae) en el genoma del nematodo *Caenorhabditis elegans*, que fueron insertadas a través de retrotransposones (Malik y cols., 2000). De igual manera Crochu y cols. identificaron retrotransposones de *Drosophila melanogaster* (Crochu y cols., 2004) en la secuencia insertada.

Cabe destacar que es la primera vez que se describe la presencia de genoma integrado en mosquitos del género *Culex* y en las especies *Oc. caspius*, *Ae. vexans* y *Oc. detritus* del género *Aedes*, ya que hasta la fecha, sólo se había visto en *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* (Crochu y cols., 2004) (*Ochlerotatus* ha sido considerado como un subgénero dentro del género *Aedes*, hasta que Reinert en el año 2006 lo elevó a la categoría de género. En esta tesis doctoral se ha mantenido la nomenclatura previa, ya que ha sido la vigente durante los años en los que se han hecho las capturas de los insectos 2001-2006).

Como ya se ha comentado anteriormente los grupos 2 y 7 no pudieron ser amplificados con la nueva técnica desarrollada para filogenia. Una posible explicación a este hecho es que como ambos grupos son de genoma integrado, algunas de las secuencias diseñadas para iniciar las reacciones de amplificación no estén integradas en el mosquito (integración parcial del ADN).

Además podemos resaltar que el grupo 1, donde las secuencias amplificadas se corresponden a ARN y donde hemos podido aislar el virus en cultivo celular, es el mayoritario y está formado fundamentalmente por mosquitos del género *Culex*. Este virus ha estado circulando en la provincia de Huelva durante los años 2002-2006. Por otra parte se ha visto que el grupo 3, presente en *Oc. caspius*, es el más ampliamente distribuido, estando presente en todas las zonas muestreadas.

Como ya se ha comentado en la introducción, una de las teorías evolutivas de este género, sitúa a este grupo de virus como un linaje basal, cuya evolución tuvo lugar antes de la separación de los grupos MBV y TBV de los virus sin vector (UNKV) (Marin y cols., 1995, Kuno y cols., 1998) y a partir de aquí fueron evolucionando y divergiendo el resto de grupos. Los resultados presentados en este trabajo apoyan esta teoría como puede observarse en los árboles filogenéticos. El actual estado evolutivo podría ser explicado por una evolución divergente que implicara una adaptación al hospedador, al vector y a la propia ecología del virus (Gaunt y cols., 2001). El estudio de las cepas detectadas en este trabajo, y el aislamiento y análisis de cepas nuevas, contribuiría al conocimiento del origen, evolución, distribución, diversidad y filogenia de los flavivirus (Cook y cols., 2006).

Los resultados presentados aportan además datos muy interesantes sobre el **rango de hospedadores de los flavivirus propios de insecto** en la naturaleza. Tal y como se había descrito los virus de insecto detectados hasta la fecha, son aparentemente capaces de crecer en células de mosquito pero no en células de vertebrados (como las Vero E6) (Cammisa-Parks y cols., 1992, Crabtree y cols., 2003, Crochu y cols., 2004, Cook y cols., 2006, Hoshino y cols., 2007). La utilización de varias líneas celulares de *Culex* y *Aedes* y también de otros vertebrados e invertebrados, confirmaría la aparente asociación al vector y la exclusividad de crecimiento en líneas celulares de insecto. Al estudiar los alineamientos de aminoácidos de la NS5, se observa que el residuo de cisteína 114, está presente en los virus de insecto encontrados en mosquitos del género *Culex* y no en *Aedes*, encontrándose exclusivamente en CxFV y nuestro grupo 1. Este residuo podría por tanto ser un marcador genético asociado al rango de hospedadores de

los virus de insecto. Otros residuos de cisteínas y un sitio de glicosilación son también característicos de determinados grupos (Figura 25).

El hecho de que CFAV en algunos casos pueda infectar C6/36 sin producir ECP, podría deberse a que estas células estén persistentemente infectadas y produzcan bajos niveles de virus, siendo resistentes a una siguiente sobreinfección por CFAV (Crabtree y cols., 2003, Sang y cols., 2003). Este fenómeno podría estudiarse secuenciando el genoma completo del virus y buscando marcadores genéticos asociados a especificidad al hospedador. Ni CFAV ni KRV causan patología aparente en los mosquitos en los que se han detectado y es importante determinar si la presencia de estos nuevos virus en los mosquitos tiene algún efecto en la super-infección con otros arbovirus. Esto sería muy relevante, ya que en este trabajo se muestra una gran variedad de especies de culícidos en los que se han detectado éstos virus (4,6 % del total de lotes analizados). En este aspecto podemos resaltar que el grupo mayoritario de este grupo de virus, es el grupo 1 detectado principalmente en mosquitos *Culex*, los cuales son el principal vector de transmisión de muchos flavivirus productores de encefalitis, como es el caso de WNV de principal interés en esta tesis doctoral, y cuya primera detección en mosquitos (*Cx. pipiens*) en nuestro país se presenta en este trabajo.

1.2 Flavivirus agrupados en la rama de los MBV.

Además de estos virus propios de insectos, se han detectado siete lotes positivos (2,3 %) con secuencias idénticas (grupo 9) que se agrupan en la rama de los MBV (a la que pertenecen virus de gran importancia sanitaria) definiendo un nuevo linaje evolutivo (Figuras 24, 27 y 44). Todas las secuencias se han detectado en *Oc. caspius* capturados en Huelva en el parque botánico José Celestino Mutis, en Los Álamos y en el palacio de Doñana durante los años 2003, 2005 y 2006. En el año 2006 el número de lotes positivos para este virus, fue cinco veces mayor (71,4 %) que en los años 2003 y 2005, aunque también en ese año hubo el doble de lotes capturados de esta especie en ese año con respecto a años anteriores, debido a una mayor abundancia del mosquito. En definitiva, los datos parecen indicar una mayor circulación del virus en esa zona en el año 2006, ya que aunque en ese año el número de mosquitos capturados fue mayor con respecto a los anteriores, no se llegó al doble de capturas.

Una clara relación encontrada es que en Doñana la abundancia de *Oc. caspius* depende de la época de lluvias, por lo que es más frecuente en los meses de primavera y otoño, y es en marzo cuando en esta zona se detectó el lote positivo. Celestino Mutis y los Álamos, sin embargo, son zonas de marisma mareal, y la abundancia del mosquito depende de la presencia de marea y de las temperaturas, siendo éstas mayores en los meses de verano, fundamentalmente agosto, que es precisamente cuando se han detectado los virus (Tabla 14).

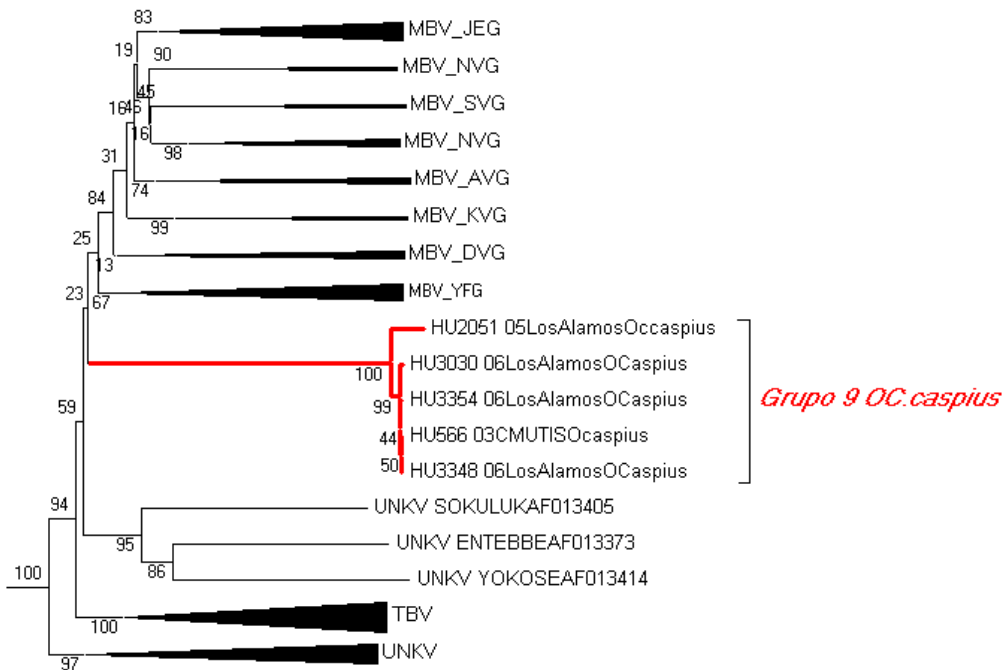


Figura 44. Detalle del árbol filogenético obtenido tras el análisis en 1.036 pb del gen NS5 del grupo 9 perteneciente a la rama MBV. El método utilizado fue Neighbor-joining y el modelo distancia-p en el programa Mega 3.1 con un valor de certidumbre de 1000 réplicas. El árbol completo se muestra en la figura 24.

Los virus del grupo MBV forman varios sero-complejos, siendo los más importantes los de YFG, JEG y DVG. La mayoría de los MBV se transmiten por mosquitos del género *Culex*, excepto DENV y YFV que se transmiten por mosquitos del género *Aedes*. Se ha postulado una relación entre la especie de mosquito y el cuadro clínico producido, asociándose los virus transmitidos por *Culex* a cuadros neurológicos y los transmitidos por *Aedes* a cuadros febriles y/o hemorrágicos (Gaunt y cols., 2001). Además hay unos virus próximos al YFG de los cuales aún se desconoce su vector (UNKV), y se cree que han tenido una pérdida secundaria del mismo (Gould y cols., 2003).

A pesar de los intentos fallidos de aislamiento del virus en cultivo celular tanto en células Vero E6 como en C6/36, en el futuro se intentará en un mayor espectro de líneas celulares y usando lotes positivos obtenidos más recientemente. El hecho de que pertenezca al grupo MBV y que la prueba de la ARNasa mostrara que no es una secuencia integrada, sugiere que se trata de un virus y que optimizando las condiciones se podrá obtener mediante aislamiento. El obtener el virus en cultivo celular será necesario para poder realizar los ensayos serológicos que permitan confirmar si realmente este virus define un nuevo serocomplejo dentro de los MBV, así como para realizar ensayos de patogenicidad viral en modelos animales y desarrollar técnicas serológicas específicas, que permitan realizar estudios de seroprevalencia en población humana y animal próximos a esta zona. En este sentido hay que resaltar que *Oc. caspius* es un mosquito altamente antropófilo, lo que aumenta la probabilidad de que los MBV que albergue sean capaces de infectar al ser humano. En este sentido, es llamativo que estas

secuencias (Grupo 9-MBV) se hayan detectado durante los años 2005 y 2006 en Los Álamos, que es una zona próxima al centro de la ciudad de Huelva y con una alta densidad de población humana.

Los virus de este grupo podrían, por lo tanto, estar infectando al hombre causando infecciones inaparentes o cuadros febriles, lo que podría explicar los casos detectados en los que se encuentran anticuerpos no neutralizantes frente a WNV en poblaciones cercanas a los lugares de aislamiento del virus (Pujol y cols., 2004, Bernabeu-Wittel y cols., 2007). Si este virus fuese patógeno para el hombre, cobraría importancia el hecho de que el mosquito *Aedes albopictus* haya sido introducido en nuestro país (Barcelona, 2004) y se esté expandiendo muy rápidamente por España (Tarragona y Valencia, 2005; Gerona, 2008), al ser un eficaz vector de transmisión de otros arbovirus como el alfavirus Chikungunya y de los flavivirus dengue y fiebre amarilla (Aranda y cols., 2006, Roiz y cols., 2007) ya que también podría serlo de este nuevo virus al compartir el género del vector.

2 ANÁLISIS MOLECULAR DEL VIRUS WEST NILE DETECTADO EN ESPAÑA

El último grupo (Grupo 10-MBV) de virus detectado se corresponde a una secuencia de WNV. Es la primera detección de WNV en España en el vector, y hasta el momento se ha detectado en un solo lote (0,3 % de los lotes positivos) en mosquitos *Cx. pipiens* del parque botánico José Celestino Mutis de Palos de la Frontera, en Huelva en el año 2006. *Cx. pipiens* es el principal vector de WNV tanto en América como en Europa, y es considerado un “vector puente”, al poderse alimentar tanto de humanos como de aves. Este mosquito se ha visto implicado en muchas de las recientes epidemias en humanos descritas en las últimas décadas en la cuenca del Mediterráneo (Tsai y cols., 1998, Beasley, 2005, Hayes y cols., 2005a, Hamer y cols., 2008).

El análisis filogenético llevado a cabo sobre 1.813 pb pertenecientes a casi la totalidad del gen de la polimerasa, muestra claramente cómo esta secuencia se agrupa dentro de la rama de WNV con altos valores de certidumbre (100 %)(Figura 34). La topología del árbol, a su vez, define una rama evolutiva común para HU2925/06 y el linaje 4 (valor de certidumbre del 100 %), los cuales, a su vez, parecen estar relacionados con el linaje 3, aunque en esta ocasión con un valor estadístico de certidumbre menor. Estos últimos linajes se han detectado recientemente en Europa (1997 y 1998, respectivamente) y no se han asociado a enfermedad en vertebrados (Tabla 20).

Al comparar las distancias genéticas de esta secuencia con los diferentes linajes de WNV (Tabla 21), la menor la tiene con el linaje 4 (18,3 % en nucleótidos y 5 % en aminoácidos) y la mayor con el linaje 5 (23,4 % en nucleótidos y 10,9 % en aminoácidos). Para estos virus, se ha definido que la distancia media en nucleótidos en la secuencia completa entre los diferentes linajes, es aproximadamente del 20 % o mayor (Berthet y cols., 1997, Lvov y cols., 2004). En nuestro análisis esta distancia fue mayor del 20 % excepto con el linaje 4 que es del 18,3 %. Teniendo en cuenta que estamos analizando el gen de la polimerasa, que es una región muy conservada, podremos asumir una distancia mayor en el genoma completo, lo que sugiere que se trataría de un linaje diferente a los

ya descritos. La secuenciación del genoma completo y la realización de ensayos antigénicos entre los diferentes linajes, confirmaría esta hipótesis. Para conseguir ambos objetivos sería muy útil contar con el virus aislado.

En esta tesis doctoral, se intentó sin éxito obtener el virus viable en cultivos celulares y en embriones de pollo y cerebro de ratón lactante. Sólo en las células C6/36 se vio ECP. En el estudio realizado por microscopía electrónica, los resultados indicaron que el ECP observado podría deberse a la infección por un alfavirus, flavivirus o pestivirus. Una doble infección viral en el lote de mosquitos explicaría este hecho si asumimos que el virus que creció, mostró una mayor eficacia que WNV en los sistemas de cultivo seleccionados. Se buscaron mediante PCRs genéricas flavivirus, alfavirus y pestivirus en el sobrenadante celular, y no se detectó amplificación para ninguno de ellos. La obtención de anticuerpos neutralizantes en conejo o en otros modelos animales, para neutralizar a este virus desconocido y poder intentar de nuevo el cultivo de WNV, podría solventar el problema. Como alternativa, se podría intentar obtener un clon infeccioso a partir de las secuencias virales encontradas en el lote. El virus viable sería imprescindible para la realización de estudios de patogenicidad en modelos animales (viendo así su potencial de virulencia). Además sería útil en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico serológicos frente a este virus, lo que permitiría revisar los estudios de seroprevalencia en la población española, y comprobar si está produciendo infecciones en humanos y/o animales, ya que hasta la fecha, estos ensayos se han realizado sólo frente al linaje 1 de WNV.

En nuestro país se han realizado algunos estudios que sugerían la presencia en humanos de WNV en la década de los años sesenta y finales de los setenta, coincidiendo con las epidemias activas por el área del Mediterráneo de esa época (Filipe y de Andrade, 1990). Sin embargo los estudios que demuestran directa o indirectamente la circulación de WNV en España son muy recientes (Bofill y cols., 2006, Kaptoul y cols., 2006, Bernabeu-Wittel y cols., 2007, Höfle y cols., 2007), incluyendo los presentados en esta tesis doctoral. Se ha detectado genoma viral en infecciones patológicas de aves, cuyo análisis reveló que el agente causal pertenecía al linaje 1 (Jiménez-Clavero y cols., 2008), que es el que se ha estado utilizando en los ensayos de neutralización realizados por Bernabeu-Wittel y por Bofill. El hecho de que se haya detectado un nuevo linaje en nuestro país, indica la co-circulación de ambos virus y, a falta de poder realizar estudios de neutralización cruzada, el virus detectado en esta tesis podría ser el causante de los casos en los que se ha visto anticuerpos no neutralizantes frente a WNV, o incluso de aquéllos en los que los títulos detectados son bajos, ya que como ya se ha mencionado, el antígeno utilizado fue una cepa de WNV de linaje 1. La ausencia de enfermedad neurológica por WNV en nuestro país podría deberse a que este linaje sea el que está infectando al hombre y no el linaje 1, ya que en los países vecinos (Francia, Marruecos y Portugal) se han producido casos humanos y/o equinos causados por el linaje 1 (Giudice y cols., 2004, Esteves y cols., 2005, Schuffenecker y cols., 2005). No podemos confirmar que este WNV sea capaz de infectar o sea el que está infectando al hombre y/o animales en España, pero el hecho de que este virus esté circulando y no se hayan detectado brotes de enfermedad en humanos, caballos o aves, puede ser debido a que este linaje de WNV sea poco

patogénico, como parece ocurrir con los linajes europeos 3 (austriaco) y 4 (ruso) (Lvov y cols., 2004, Bakonyi y cols., 2005), y que esté protegiendo a las aves (dados los altos niveles de prevalencia de anticuerpos neutralizantes presentes tanto en aves migratorias como residentes de la zona de Doñana) de la infección frente a las variantes más virulentas y patogénicas del virus.

En este sentido, el marcado neurotropismo demostrado por las cepas de WNV responsables de los brotes registrados recientemente en la cuenca mediterránea (linaje 1), hace suponer que la circulación de WNV en la región debería traducirse, en la aparición de casos de meningitis y encefalitis víricas y que podrían quedar sin diagnosticar. Es necesario concienciar a los clínicos y veterinarios de la posibilidad de que WNV esté causando casos de enfermedad en humanos y equinos durante los periodos de transmisión potencial del mismo. Esto parece poco probable atendiendo a los estudios de seroprevalencia realizados en nuestro país, y a que en el Centro Nacional de Microbiología se ha llevado a cabo una búsqueda activa de este virus en muestras de pacientes con cuadros neurológicos, no habiéndose confirmado ninguno de los casos estudiados (A. Tenorio, comunicación personal). No obstante, gran parte de los casos de encefalitis de supuesta etiología vírica que se producen en España quedan sin diagnosticar, aún después de realizar estudios de laboratorio exhaustivos, por lo que está justificado realizar estudios específicos de diagnóstico de infección por WNV en las encefalitis agudas que se produzcan en las zonas de riesgo, utilizando las mejores herramientas de diagnóstico posibles. Así, sería importante además intentar realizar en dichas áreas, estudios destinados a aislar cepas de WNV a partir de los reservorios animales y los vectores potenciales. Tenemos que tener en cuenta además que este virus puede ser endémico del país, y otros autores han sugerido que WNV produce infecciones principalmente en niños durante los meses de verano, siendo éstas autolimitadas, de enfermedad febril y raramente asociadas a encefalitis (Murgue y cols., 2001a). La obtención y estudio de diferentes aislados nos permitiría observar variaciones genéticas para ver si la variabilidad depende o no de la reintroducción anual del virus en aves migratorias (Jupp, 2001).

3 REVISIÓN DE GENOTIPOS DE WNV

La secuenciación y análisis del genoma completo de la cepa MP502/66 de KUNV cuya clasificación no estaba clara, mostró cómo este virus se sitúa claramente dentro de la rama de los WNV, pero en una rama evolutiva independiente del resto de los cinco linajes previamente conocidos (Figura 32). El cálculo de las distancias en poliproteína entre este virus en comparación con el resto de los WNV publicados hasta la fecha (Tabla 19), mostró unas distancias en nucleótidos superiores al 20 % entre todos ellos, ajustándose por tanto a la definición realizada para los linajes de WNV. La información que aporta esta tesis doctoral, junto con ensayos antigénicos previos realizados con esta cepa (Scherret y cols., 2001), nos permite concluir que nos encontramos ante un nuevo linaje (linaje 6) de WNV.

Aún se desconoce si este virus es patogénico o no, o si produce infecciones en humanos y/o animales. Lo mismo sucede con los linajes 3, 4 y el reciente virus detectado

en España, resultando claro que los WNV del linaje 1 son los más virulentos. Algunos autores han asociado las diferencias en la neurovirulencia de las cepas a cambios aminoacídicos en la proteína E, que influirían en su unión al receptor (McMinn, 1997). Sin embargo, aún no se han identificado claramente los determinantes moleculares responsables para esta virulencia diferencial. Hay factores que favorecen la replicación viral, así como la entrada a las células que podrían ser importantes para la patogénesis viral (Hanna y cols., 2005). Uno de los sitios importantes en la proteína E es un sitio de N-glicosilación (NYS), que está presente en las cepas más neurovirulentas, aunque no está presente en todas las cepas del linaje 1 y sólo en algunas del linaje 2. En la secuencia analizada de este nuevo linaje, este sitio está mutado, lo que podría indicar una menor neurovirulencia del virus. Tampoco encontramos otros sitios aminoacídicos que se han implicado en la atenuación viral, como las sustituciones en los residuos 68 (L→P) y en el 307 (K→E), la delección en la posición 277 o un cambio aminoacídico de S→I (que en MVEV disminuiría la neuroinvasividad en ratones o el crecimiento en células Vero)(Chambers, 1998, May y cols., 2006).

Dada la complejidad de estos análisis, una de las líneas de desarrollo abiertas a partir de esta tesis doctoral, es la obtención de un clon infeccioso del virus West Nile sobre el que realizar estudios de genética reversa que permitan identificar inequívocamente los marcadores de neuroinvasividad y neuropatogenicidad del virus.

La característica que comparten los linajes 3, 4, 6 y el detectado en este trabajo, aparte del desconocimiento en cuanto a su importancia en salud pública, es que han sido detectados y/o aislados una única vez. Una posible explicación sería el mantenimiento del virus en ciclos rurales o enzoóticos, con focos de actividad viral generalmente silenciosos que podrían activarse en cualquier momento con la presencia de factores bióticos o abióticos favorables (Hubalek, 2000). Todos estos virus, se distribuyen dentro de la rama de los WNV en grupos separados (Figura 34).

Existen diferencias importantes en el patrón epidemiológico de la circulación del virus entre Norteamérica y Europa, o incluso entre América del norte y los trópicos (ya que las infecciones por WNV han sido raras en humanos y equinos en el Caribe o en América del sur y central). La razón por la que humanos y equinos no desarrollan enfermedad neurológica severa en áreas tropicales americanas, podría ser una protección cruzada de anticuerpos frente a otros flavivirus. En el Caribe, centro y sur de América hay numerosos flavivirus endémicos y/o enzoóticos, incluyendo DENV, SLEV, YFV, ILHV, ROCV, CPCV, AROAV, NJLV, BSQV e IGUV, muchos de los cuales son miembros del sero-grupo de la JE, que podrían reducir la carga viral y viremia por WNV, y su transmisión (Tesh y cols., 2002). Hasta la fecha, sin embargo, no está confirmado que la vacunación o exposición con flavivirus heterólogos proporcione algún tipo de protección frente a WNV. Otra posible explicación sería la circulación de variantes menos virulentas que sí podrían conferir cierta protección (Beasley y cols., 2004). Algo similar podría estar sucediendo en Europa, donde circulan varios linajes, algunos de ellos poco patogénicos, lo que podría favorecer la teoría de la protección cruzada.

Por otro lado, la aparición en el continente europeo de un virus similar a WNV como Usutu (2001 en Austria, 2003 en Reino Unido, 2005 en Hungría y en el 2006 en España) (Weissenböck y cols., 2002, Buckley y cols., 2003, Bakonyi y cols., 2007,

Busquets y cols., 2008), se ajustaría a la hipótesis de la reacción cruzada entre diferentes flavivirus. USUV es un flavivirus africano del JEG que nunca antes del año 2001, se había detectado fuera de este continente y tampoco se había asociado a enfermedad ni muerte en aves. La circulación de éste u otros flavivirus (como el que define el grupo 9 encontrado en *Oc. Caspius*) o de linajes virales de WNV menos virulentos, como podría ser el detectado en este trabajo (HU2925/06) en *Cx. pipiens*, apoyarían por tanto la hipótesis de la protección en la población del viejo continente, tanto en aves, humanos y/u otros animales, frente a infecciones por WNV, actuando como una vacuna natural frente a este virus.

4 DESARROLLO DE UN NUEVO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE TODOS LOS GENOTIPOS DE WNV

Es evidente la amplia distribución geográfica de WNV y la presencia de un gran número de linajes, lo que se traduce en una amplia variedad genética del mismo y una alta variedad de cuadros clínicos asociados a la infección. Por ello, resultaría muy conveniente implementar programas de vigilancia que tengan en cuenta la amplia diversidad viral para realizar un correcto diagnóstico y vigilancia.

Tal como se ha mencionado previamente, en nuestro país se han realizado búsquedas activas del virus en muestras de pacientes con cuadros neurológicos. La no detección no implica la ausencia de circulación del virus, y de cara a refinar los procedimientos utilizados en estudios de búsqueda del virus y en la rutina diagnóstica, es necesario contar con las mejores herramientas moleculares. La reciente descripción de nuevos linajes y la obtención de su secuencia, nos ha permitido realizar una revisión de las secuencias genómicas de los mismos y desarrollar una PCR en tiempo real, que nos permite detectar cualquiera de estos linajes con una alta sensibilidad y en un corto periodo de tiempo (cuatro horas frente a los días o incluso semanas si lo comparamos con los métodos convencionales de RT-Nested-PCR o aislamiento viral). Además se tuvo en cuenta en el diseño de la técnica, que la diana de amplificación fuese una región del genoma muy conservada para los WNV, de manera que nos permitiese detectar los diferentes linajes con el menor número de degeneraciones posibles, y minimizar también los resultados falsos negativos debidos a la variabilidad viral (Tang y cols., 2006). A pesar de no haber sido aún validada con muestras clínicas humanas positivas, ya que en España esta infección no es habitual, se han ensayado LCR y sueros de pacientes con sospecha de infección por WNV y que habían demostrado ser negativos mediante ensayos serológicos y moleculares. Todos los resultados fueron asimismo negativos, confirmando que la técnica no ofrece resultados falsos positivos. El uso de un control interno de amplificación también se utilizó para evitar resultados falsos negativos.

Esta nueva metodología tiene una gran aplicabilidad potencial, tanto para diagnóstico como para la vigilancia del virus, debido a que hasta la fecha, las técnicas utilizadas únicamente estaban dirigidas a los linajes 1 y 2 (Lanciotti y cols., 2000, Shi y cols., 2001, Shirato y cols., 2005, Jiménez-Clavero y cols., 2006, Tang y cols., 2006, Linke y cols., 2007). La monitorización y la rápida detección de WNV es imprescindible para conocer el comportamiento y distribución del virus, y para llevar a cabo una buena vigilancia, control y prevención de la enfermedad.

5 SÍNTESIS

Como reflexión final se debe resaltar que la existencia de factores intrínsecos al propio virus y extrínsecos (asociados a hospedadores, vectores y medio ambiente) determinan la ecología, comportamiento y efectos de estos virus (Gubler, 2007) y en el escenario actual de cambio climático, resulta imprescindible obtener datos sobre estos aspectos para prevenir la emergencia de enfermedades causadas por flavivirus y minimizar los efectos de los ya circulantes.

Como resumen del trabajo desarrollado en esta tesis doctoral, centrada en la investigación en torno a WNV y otros flavivirus, podemos decir que hemos detectado numerosas secuencias de flavivirus propios de insecto potencialmente circulantes en nuestro país, siendo de especial interés la detección de un nuevo linaje de WNV así como los componentes del grupo 9-MBV.

Hay que tener en cuenta que en España no se han descrito brotes de infección por WNV (a diferencia de lo descrito en países del entorno) ni en humanos ni animales. Los estudios serológicos recientes realizados en humanos, revelaron bajos niveles de seroprevalencias, por lo que las infecciones por WNV y/u otros flavivirus relacionados, son escasas, siendo del 3,83 % en la población del delta del Ebro (Bofill y cols., 2006), confirmándose por neutralización frente a WNV sólo el 0,2 % y en Sevilla del 1 % confirmándose el 0,6 % (Bernabeu-Wittel y cols., 2007). Sin embargo la infección por WNV en caballos y aves (residentes y migratorias) de la región de Doñana, se ha confirmado con la presencia de altas prevalencias de anticuerpos neutralizantes (Figueroa y cols., 2007b, Figuerola y cols., 2007a, López y cols., 2008). Por lo tanto, la posibilidad de que haya un virus antigénicamente relacionado con WNV (del linaje 1 que es con el que se realizaron los ensayos serológicos) menos patogénico, que esté confiriendo inmunidad al hombre es poco probable, pero sí en las aves, principal hospedador amplificador de estos virus, haciendo que se produzcan infecciones poco patogénicas en las mismas, impidiendo que desarrollen altos niveles de viremia, por lo que no se llegan a producir brotes. Esta tesis doctoral ha aportado dos candidatos a ejercer esta función (el HU2925/06, nuevo linaje de WNV que circula en el país, y también los componentes del grupo 9).

Otra posible explicación que podemos sacar de los resultados obtenidos de esta tesis, es que como ya hemos comentado, el vector principal de WNV es *Cx. pipiens*, y se han encontrado numerosos mosquitos *Culex* infectados por un flavivirus similar al CxFV.

Estos virus propios de insecto podrían estar protegiendo al mosquito de una superinfección por WNV estableciendo una competencia en el propio vector para el que los virus del grupo 1 presentarían una mejor adaptabilidad. Esta competencia entre virus en el vector podría afectar a su propia competencia vectorial, tal como se ha postulado por algunos autores (Crabtree y cols., 2003, Sang y cols., 2003), y es algo que sería muy importante determinar, ya que los mosquitos son vectores de transmisión para muchas enfermedades de importancia mundial.

La posibilidad de que un brote de enfermedad por WNV hubiera tenido lugar recientemente y no hubiese sido detectado es poco probable, debido a que en estos años se han hecho búsquedas activas del virus y sólo se ha detectado un caso en el país pero búsquedas específicas con técnicas como la PCR en tiempo real desarrollada en esta tesis ayudarán a detectar el virus, sea cual sea su linaje o genotipo, cuando circule.

Queda patente la necesidad de trabajos futuros para demostrar esta hipótesis y todas las nuevas dianas de investigación abiertas en esta tesis que tienen como objetivo último la prevención de la aparición de enfermedades transmitidas por vectores en la cuenca mediterránea.

Conclusiones

1. Se ha detectado la presencia de genoma de nuevos grupos de flavivirus propios de insecto, no relacionados con los transmitidos por mosquito, por garrapata o sin vector conocido, en gran variedad de especies de mosquitos de los humedales españoles. Los datos muestran una co-circulación de dos o más de estos flavivirus en una misma zona y en el mismo año. Algunos de los flavivirus detectados en especies relacionadas evolutivamente parecen también estar filogenéticamente relacionados entre sí.
2. Algunos de los grupos detectados corresponden a genoma de flavivirus integrado en el genoma del insecto. En ciertos casos la integración detectada parece estable, lo que podría proporcionar algún tipo de ventaja evolutiva a la población de mosquitos afectada. En otros casos, las integraciones no han sido capaces de perdurar en el tiempo. Por primera vez se describe este fenómeno en el género *Culex* y para las especies *Oc. caspius*, *Ae. vexans* y *Oc. detritus*.
3. Es la primera vez que se describe la presencia de flavivirus en flebotomos fuera del continente africano.
4. Se ha detectado un nuevo flavivirus en *Oc. Caspius* con potencial impacto en la salud pública y en la sanidad animal. El genoma de este nuevo flavivirus está relacionado con los flavivirus transmitidos por mosquito y podría definir un nuevo grupo evolutivo en este grupo.
5. Se ha detectado por primera vez en España el virus West Nile en mosquitos. El virus detectado parece definir un nuevo linaje de WNV que podría estar

produciendo infecciones en la población humana o en animales y estar protegiendo a las aves de la infección por variantes más virulentas de WNV.

6. Con la secuencia aportada de la cepa KUNV MP502/66, y el estudio filogenético realizado, se describe la existencia de 6 linajes evolutivos para WNV y un posible linaje 7 que circularía, al menos, en el sur de España.
7. El uso de métodos moleculares genéricos ha demostrado ser una buena herramienta de detección de nuevos virus. Los métodos de amplificación genómica desarrollados en este trabajo de investigación tienen en cuenta la variabilidad natural de los flavivirus y han mostrado ser útiles para el diagnóstico y la clasificación filogenética de los flavivirus.
8. La PCR en tiempo real desarrollada en esta tesis doctoral tiene en cuenta la amplia variedad de linajes del virus, en algunos de los cuales la patogenicidad es aún desconocida pero que podrían estar produciendo infecciones en humanos y/o animales, por lo que tiene un elevado potencial como herramienta de diagnóstico y de vigilancia de las infecciones por WNV.

Listado de Figuras

Figura 1. Esquema de la morfología de los flavivirus.....	4
Figura 2. Esquema de la estructura genómica de los flavivirus.	5
Figura 3. Esquema del ciclo replicativo de los flavivirus.	9
Figura 4. Árboles filogenéticos que explican las dos hipótesis evolutivas descritas para el género <i>Flavivirus</i>	12
Figura 5. Árbol filogenético del género <i>Flavivirus</i> basado en el gen NS5.....	15
Figura 6. Distribución geográfica de los flavivirus más patógenos para el hombre del complejo antigénico de la JE.	18
Figura 7. Representación geográfica de las seroprevalencias obtenidas en humanos, roedores, aves y caballos frente a flavivirus y WNV en España.	24
Figura 8. Distribución geográfica de los linajes de WNV.....	26
Figura 9. Ciclo biológico de WNV	28
Figura 10. Cinética de aparición de la viremia y de la respuesta inmunitaria en las infecciones por WNV.....	33
Figura 11: Humedales muestreados para culícidos y flebotomos.....	37
Figura 12: Trampas utilizadas en las capturas de los insectos.....	38
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio de los productos de amplificación de la RT-Nested PCR de detección para flavivirus..	41
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio de los productos de amplificación de la Nested-PCR de WNV..	42
Figura 15. Cebadores seleccionados para la amplificación del fragmento del gen NS5.....	45
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio de los productos de amplificación de la RT-Nested-PCR genérica para filogenia en el gen NS5..	46
Figura 17. Sensibilidad de la RT-Nested-PCR diseñada en el gen NS5 para estudios de filogenia.	47
Figura 18. Validación de la RT-Nested-PCR para filogenia con diferentes flavivirus de importancia sanitaria para el hombre.	47
Figura 19. Validación de la RT-Nested-PCR para filogenia con muestras clínicas.	48
Figura 20. Validación de la prueba de la ribonucleasa con controles positivos de ARN.	49

Figura 21. Esquema del funcionamiento de la PCR en tiempo real.	54
Figura 22. Árbol filogenético de los flavivirus basado en 87 nucleótidos del gen NS5.....	64
Figura 23. Árbol filogenético de los flavivirus basado en 272 nucleótidos del gen NS5.....	65
Figura 24. Árbol filogenético de los flavivirus basado en 1.036 nucleótidos del gen NS5.....	67
Figura 25. Representación en aminoácidos de sitios de interés de la proteína NS5 de los flavivirus de insecto.....	70
Figura 26. Árbol evolutivo de los flavivirus de insecto, basado en 1036 pb del gen NS5.	71
Figura 27. Árbol evolutivo basado en 1.036 pb del gen NS5 de los flavivirus del grupo 9 detectados en <i>Oc. caspius</i> en España.....	71
Figura 28. Resultados de la prueba de la ribonucleasa.....	72
Figura 29. Esquema de la estrategia seguida para la amplificación del genoma completo de la cepa KJ502/66.....	74
Figura 30. Organización del genoma completo de KJ502/66.	75
Figura 31. Sitio de glicosilación de la envuelta de los WNV.	76
Figura 32. Árbol filogenético del genoma completo de KJ502/66.	78
Figura 33. Estrategia de secuenciación para la amplificación de 1.813 pb del gen NS5 del WNV español.....	79
Figura 34. Árbol filogenético de 1.813 pb del gen NS5 de WNV incluyendo el encontrado en España.....	80
Figura 35. Esquema de los cultivos virales de WNV (HU2925/06) encontrado en España.....	84
Figura 36. Imágenes tomadas por M.E. de la muestra obtenida de C6/36.....	85
Figura 37. Sensibilidad en la detección del control interno mediante la PCR en tiempo real.	86
Figura 38. Prueba de sensibilidad para el linaje 1 de WNV.....	87
Figura 39. Representación de la curva de sensibilidad de la PCR en tiempo real.....	88
Figura 40. Límite de detección de la muestra HU2925/06 con la PCR en tiempo real.....	88
Figura 41. Representación de los lotes positivos para flavivirus por meses y años de captura.....	90
Figura 42. Representación filogenética de los flavivirus propios de insecto junto con los obtenidos en este trabajo.....	91
Figura 43. Detalle del árbol obtenido tras el análisis de 87 pb de los grupos de virus de ADN encontrados.....	95
Figura 44. Detalle del árbol filogenético obtenido tras el análisis en 1.036 pb del gen NS5 del grupo 9 perteneciente a la rama MBV.....	98

Listado de tablas

Tabla 1. Resumen de los virus pertenecientes a la familia <i>Flaviviridae</i> , junto con sus hospedadores habituales, modo de transmisión, enfermedad que producen y distribución.....	3
Tabla 2. Clasificación taxonómica de los virus pertenecientes al género <i>Flavivirus</i> ..	11
Tabla 3. Resumen de los flavivirus propios de insecto descritos hasta la fecha. ..	14
Tabla 4. Resumen de algunas de las características de los virus pertenecientes al complejo antigénico de la Encefalitis Japonesa.....	17
Tabla 5. Resumen de los brotes de enfermedad por WNV más recientes ocurridos en Europa tanto en el ser humano como en el ganado equino..	179
Tabla 6. Resumen de la expansión realizada por WNV hacia el sur del continente americano.	21
Tabla 7. Cebadores utilizados en la RT-Nested-PCR genérica de flavivirus.	40
Tabla 8. Cebadores utilizados en la Nested-PCR específica de WNV.	41
Tabla 9. Cebadores utilizados en la RT-Nested-PCR genérica en el gen NS5 para filogenia y en la secuenciación del producto amplificado.....	46
Tabla 10. Cebadores utilizados para la amplificación del genoma completo de KUNV.....	51
Tabla 11. Resumen de las especies de mosquitos analizadas para este estudio..	62
Tabla 12. Resumen de los diferentes grupos de flavivirus obtenidos.	63
Tabla 13. Resumen de las secuencias obtenidas en el fragmento de 1.036 pb del gen NS5 de los diferentes grupos de flavivirus encontrados.	66
Tabla 14. Datos identificativos de los lotes de mosquitos donde se encontraron las secuencias relacionadas a los flavivirus transmitidos por mosquitos (MBV).....	68
Tabla 15. Porcentaje de las distancias en aminoácidos calculadas en el fragmento de 1.036 pb del gen NS5.....	68
Tabla 16. Resumen de los residuos de cisteínas presentes en la región de la proteína NS5 encontrados en las muestras de nuestro estudio.	69
Tabla 17. Resultados de la prueba de la ribonucleasa.	73
Tabla 18. Sitios de corte propuestos para la poliproteína de los WNV.....	77
Tabla 19. Diferencias genómicas entre los diferentes grupos de WNV, JEV y USUV en la zona codificante del genoma.	78

Tabla 20. Resumen de las principales características de los diferentes linajes del WNV.....	80
Tabla 21. Diferencias genómicas entre los diferentes grupos de WNV, JEV y USUV en 1.813 pb del gen NS5.....	81
Tabla 22. Datos de los cultivos en células C6/36 y Vero E6 de algunos flavivirus de los mosquitos españoles.	82
Tabla 23. Resumen de los diferentes grupos de flavivirus detectados.	93

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
aa-NE	Aminoácidos no esenciales
Acs	Anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVG	Grupo de virus Aroa
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CFAV	<i>Virus Cell Fusing Agent</i>
CI	Control interno
CSA	<i>Cell Silent Agent</i>
CxFV	<i>Virus Culex Flavivirus</i>
DENV	Virus dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
dpi	Día post-infección
DVG	Grupo de virus dengue
ECP	Efecto citopático
EEUU	Estados Unidos de América
ELISA	Inmunoensayo enzimático en fase sólida
EMEM	Medio Esencial Mínimo con sales de Eagle
g	Gramo
IC	Intracraneal
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN- γ	Interferón gamma
IH	Inhibición de la Hemaglutinación
IL	Interleuquina
JEV	Virus de la Encefalitis Japonesa
JEG	Grupo de la Encefalitis Japonesa

Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
KRV	Virus Kamiti River
KUNV	Virus Kunjin
KVG	Grupo de virus Kokobera
LA	Líquido alantoideo
log ₂	Logaritmo en base 2
log ₁₀	Logaritmo en base 10
MACAW	<i>Multiple Alignment Construction and Analysis Workbench</i>
MBV	Virus transmitidos por mosquitos (<i>Mosquito-Borne Virus</i>)
M.E.	Microscopia electrónica
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>
ML	Máxima verosimilitud (<i>Maximum likelihood</i>)
MTBV	<i>Mammalian tick-borne virus complex</i>
MVEV	Virus de la Encefalitis de Murray Valley
mg	Miligramo
ml	Mililitro
NC	No codificante
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nested-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa anidada
Ng	Nanogramo
NVG	Grupo de virus Ntaya
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Marcador de peso molecular
Pmol	Picomoles
RE	Retículo endoplasmático
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
S	Coefficiente de sedimentación
SLEV	Virus de la Encefalitis de Saint Louis
SNC	Sistema nervioso central
SFB	Suero fetal bovino
STBV	<i>Seabird tick-borne virus complex</i>
SVG	Grupo de virus Spondweni
TABV	Virus Tamana bat
TBE	Tampón tris-borato-EDTA
TBEV	Virus de la Encefalitis transmitida por garrapatas
TBV	Virus transmitidos por garrapata (<i>Tick-Borne Virus</i>)
UNKV	Virus con vector artrópodo desconocido (<i>Unknown arthropod vector</i>)
USUV	Virus Usutu

WNV	Virus West Nile
YFV	Virus de la fiebre amarilla
YFG	Grupo de virus de la fiebre amarilla
ZIKV	Virus Zika
μl	Microlitro
μg	Microgramo
μM	Micromolar

Bibliografía

- Anderson, J. F., A. J. Main. 2006.** Importance of Vertical and Horizontal Transmission of West Nile Virus by *Culex pipiens* in the Northeastern United States. *The Journal of Infectious Diseases*. 194: 1577–1579.
- Aranda, C., R. Eritja, D. Roiz. 2006.** First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Med Vet Entomol*. 20: 150-152.
- Bakonyi, T., Z. Hubalek, I. Rudolf, Nowotny, N. 2005.** Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis*. 11: 225-231.
- Bakonyi, T., E. Ivanics, K. Erdélyi, Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H., Nowotny, N. 2006.** Lineage 1 and 2 Strains of Encephalitic West Nile Virus, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 12: 618-623.
- Bakonyi, T., K. Erdélyi, K. Ursu, Ferenczi, E., Csorgo, T., Lussy, H., Chvala, S., Bukovsky, C., Meister, T., Weissenböck, H., Nowotny, N. 2007.** Emergence of Usutu Virus in Hungary. *J Clin Microbiol*. 45: 3870-3874.
- Bakonyi, T., E. A. Gould, J. Kolodziejek, H. Weissenböck, N. Nowotny. 2004.** Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001 Comparison with the South African Strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology*. 328: 301– 310.
- Banet-Noach, C., M. Malkinson, A. Brill, I. Samina, H. Yadin, Y. Weisman, S. Pokamunski, R. King, V. Deubel, Y. Stram. 2003.** Phylogenetic relationships of West Nile viruses isolated from birds and horses in Israel from 1997 to 2001. *Virus Genes*. 26: 135–141.
- Beasley, D. W., C. T. Davis, J. Estrada-Franco, R. Navarro-Lopez, A. Campomanes-Cortes, R. B. Tesh, S. C. Weaver, A. D. Barrett. 2004.** Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico. *Emerg Infect Dis*. 10: 2221-2224.
- Beasley, D. W. C. 2005.** Recent Advances in the Molecular Biology of West Nile Virus. *Current Molecular Medicine* 5: 835-850.
- Bernabeu-Wittel, M., M. Ruiz-Pérez, M. D. del Toro, J. Aznar, A. Muniain, F. de Ory, C. Domingo, J. Pachón. 2007.** West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 25: 561-565.
- Berthet, F.-X., H. Zeller, M.-T. Drouet, J. Raugier, J.-P. Digoutte, V. Deubel. 1997.** Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *Journal of General Virology*. 78: 2293–2297.
- Bertolotti, L., U. Kitron, T. L. Goldberg. 2007.** Diversity and evolution of West Nile virus in Illinois and the United States, 2002-2005. *Virology* 360: 143-149.
- Bessaud, M., B. A. Pastorino, C. N. Peyrefitte, D. Rolland, M. Grandadam, H. J. Tolou. 2006.** Functional characterization of the NS2B/NS3 protease complex from seven viruses belonging to different groups inside the genus *Flavivirus*. *Virus Res*. 120: 79-90.

- Billoir, F., R. de Chesse, H. Tolou, P. de Micco, E. A. Gould, X. de Lamballerie. 2000.** Phylogeny of the genus *Flavivirus* using complete coding sequences of arthropod-borne viruses and viruses with no known vector. *J Gen Virol* 81: 781–790.
- Blitvich, B. J., I. Fernandez-Salas, J. F. Contreras-Cordero, N. L. Marlenee, J. I. Gonzalez-Rojas, N. Komar. 2003.** Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 9: 853–856.
- Blitvich, B. J., I. Fernandez-Salas, J. F. Contreras-Cordero, N. L. Marlenee, J. I. Gonzalez-Rojas, N. Obregón-Martínez, J. A. Chiu-García, W. C. Black, B. J. Beaty. 2004.** Phylogenetic analysis of West Nile virus, Nuevo Leon State, Mexico. *Emerging Infect. Dis.* 10: 1314–1317.
- Bode, A. V., J. J. Sejvar, W. J. Pape, G. L. Campbell, A. A. Marfin. 2006.** West Nile virus disease: a descriptive study of 228 patients hospitalized in a 4-county region of Colorado in 2003. *Clin Infect Dis.* 42: 1234-1240.
- Bofill, D., C. Domingo, N. Cardenosa, J. Zaragoza, F. de Ory, S. Minguell, M. P. Sanchez-Seco, A. Dominguez, A. Tenorio. 2006.** Human West Nile virus infection, Catalonia, Spain. *Emerg Infect Dis.* 12: 1163-1164.
- Bondre, V. P., R. S. Jadhav, A. C. Mishra, P. N. Yergolkar, V. A. Arankalle. 2007.** West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *Journal of General Virology.* 88: 875–884.
- Bosch, I., F. Herrera, J. C. Navarro, M. Lentino, A. Dupuis, J. Maffei, M. Jones, E. Fernández, N. Pérez, J. Pérez-Emán, A. E. Guimarães, R. Barrera, N. Valero, J. Ruiz, G. Blásquez, J. Martínez, G. Comach, N. Komar, A. Spielman, L. Kramer. 2007.** West Nile virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis.* 13: 651-653.
- Botha, E. M., W. Markotter, M. Wolfaardt, J. T. Paweska, R. Swanepoel, Palacios, G., Nel, L.H., Venter, M. 2008.** Genetic Determinants of Virulence in Pathogenic Lineage 2 West Nile Virus Strains. *Emerg Infect Dis.* 14: 222-230.
- Brinton, M. A. 2002.** The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol.* 56: 371-402.
- Buckley, A., A. Dawson, S. R. Moss, Hinsley, S.A., Bellamy, P.E., Gould, E.A. 2003.** Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J Gen Virol.* 84: 2807-2817.
- Burt, F. J., A. A. Grobelaar, P. A. Leman, Anthony, F.S., Gibson, G.V.F., Swanepoel, R. 2002.** Phylogenetic Relationships of Southern African West Nile Virus Isolates. *Emerg Infect Dis.* 8: 820-826.
- Busquets, N., A. Alba, A. Allepuz, Aranda, C., Núñez, J.I. 2008.** Usutu Virus Sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerg Infect Dis.* 14: 861-862.
- Calisher, C. H., E. A. Gould. 2003.** Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv Virus Res.* 59: 1-19.
- Calisher, C. H., N. Karabatsos, J. M. Dalrymple, Shope, R.E., Porterfield, J.S., Westaway, E.G., Brandt, W.E. 1989.** Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. virol.* 70: 37-43.
- Cammisa-Parks, H., L. A. Cisar, A. Kane, Stollar, V. 1992.** The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology.* 189: 511–524.
- Campbell, G. L., A. A. Marfin, R. S. Lanciotti, Gubler, D.J. 2002.** West Nile virus. *Lancet Infect Dis.* 2: 519-529.
- Cantile, C., G. Di Guardo, C. Eleni, Arispici, M. 2000.** Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet. J.* 32: 31-35.
- Castillo-Olivares, J., J. Wood. 2004.** West Nile virus infection of horses. *Vet. res.* 35: 467–483.

- Cleaves, G. R., Ryan, T.E., Schlesinger, R.W. 1981.** Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. *Virology*. 111: 73-83.
- Cook, S., E. C. Holmes. 2005.** A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Arch. Virol.* 151: 309–325.
- Cook, S., S. N. Bennett, E. C. Holmes, De Chesse, R., Moureau, G., de Lamballerie, X. 2006.** Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J. Gen. Virol.* 87: 735–748.
- Crabtree, M. B., R. C. Sang, V. Stollar, Dunster, L.M., Miller, B.R. 2003.** Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus. Kamiti River virus. *Arch. Virol.* 148: 1095–1118.
- Crochu, S., S. Cook, H. Attoui, Charrel, R.N., de Chesse, R., Belhouchet, M., Lemasson, J.J., de Micco, P., de Lamballerie, X. 2004.** Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J. Gen. Virol.* 85: 1971–1980.
- Cruz, L., V. M. Cardenas, M. Abarca, Rodriguez, T., Reyna, R.F., Serpas, M.V. 2005.** Short report: serological evidence of West Nile virus activity in El Salvador. *Am J Trop Med Hyg.* 72: 612–615.
- Chambers, T. J., M. S. Diamond. 2003.** Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Adv Virus Res.* 60: 273-342.
- Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler, Rice, C.M. 1990.** Flavivirus genome organization, expression and replication. *Ann Rev Microbiol.* 44: 649–688.
- Chambers, T. J., Halevy, M., Nestorowicz, A., Rice, C.M., Lustig, S. 1998.** West Nile virus envelope proteins: nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness. *J Gen Virol.* 79: 2375-2380.
- Chang, K. J. 1997.** Studies on the serological cross-reaction between dengue and Japanese encephalitis. *J Microbiol Immunol Infect.* 30: 207-218.
- Chappell, K. J., T. A. Nall, M. J. Stoermer, Fang, N.X., Tyndall, J.D., Fairlie, D.P., Young, P.R. 2005.** Site-directed mutagenesis and kinetic studies of the West Nile Virus NS3 protease identify key enzyme-substrate interactions. *J Biol Chem.* 280: 2896-2903.
- Chastel, C., H. Launay, G. Rogues, Beaucournu, J.C. 1980.** Arbovirus infections in Spain: serological survey on small mammals. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 73: 384-390.
- Chu, J. J., M. L. Ng. 2004.** Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol.* 78: 10543-10555.
- Chu, P. W., E. G. Westaway. 1985.** Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology.* 140: 68-79.
- Dauphin, G., S. Zientara, H. Zeller, Murgue, B. 2004.** West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 27: 343-355.
- Davis, B. S., G. J. Chang, B. Cropp, Roehrig, J.T., Martin, D.A., Mitchell, C.J., Bowen, R., Bunning, M.L. 2001.** West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol.* 75: 4040-4047.
- Davis, C. T., G. D. Ebel, R. S. Lanciotti, Brault, A.C., Guzman, H., Siirin, M., Lambert, A., Parsons, R.E., Beasley, D.W., Novak, R.J., Elizondo-Quiroga, D., Green, E.N., Young, D.S., Stark, L.M., Drebot, M.A., Artsob, H., Tesh, R.B., Kramer, L.D., Barrett, A.D. 2005.** Phylogenetic analysis of North American West Nile virus isolates, 2001-2004: evidence for the emergence of a dominant genotype. *Virology.* 342: 252-265.

- Davis, C. W., H. Y. Nguyen, S. L. Hanna, Sánchez, M.D., Doms, R.W., Pierson, T.C. 2006a.** West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J Virol.* 80: 1290-1301.
- Davis, L. E., R. DeBiasi, D. E. Goade, Haaland, K.Y., Harrington, J.A., Harnar, J.B., Pergam, S.A., King, M.K., DeMasters, B.K., Tyler, K.L. 2006b.** West Nile virus neuroinvasive disease. *Ann Neurol.* 60: 286-300.
- de Lamballerie, X., S. Crochu, F. Billoir, Neyts, J., de Micco, P., Holmes, E.C., Gould, E.A. 2002.** Genome sequence analysis of Tamana bat virus and its relationship with the genus *Flavivirus*. *J Gen Virol.* 83: 2443-2454.
- Diamond, M. S., E. M. Sitati, L. D. Friend, Higgs, S., Shrestha, B., Engle, M. 2003.** A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J Exp Med.* 198: 1853-1862.
- Domingo, C., G. Palacios, M. Niedrig, Cabrerizo, M., Jabado, O., Reyes, N., Lipkin, W.I., Tenorio, A. 2004.** A New Tool for the Diagnosis and Molecular Surveillance of Dengue Infections in Clinical Samples. *Dengue Bulletin.* 28: 87-95.
- Domingo, C., X. Collao, A. Falcón, Ledesma, J., Negredo, A., Pozo, F., Roiz, D., Vázquez, A., Vázquez, S. 2007.** Virus importados en nuestro ámbito sanitario: situación actual y riesgos de futuro. *Virología.* 12: 7-35.
- Dopazo, J., F. Sobrino. 1992.** A computer program for the design of PCR primers for diagnosis of highly variable genomes. *J. Virol. Meth.* 41: 157-166.
- Drynov, I. D., L. V. Uryvaev, V. V. Nosikov, Zhdanov, V.M. 1981.** Integration of the genomes of the tick-borne encephalitis virus and of the cell in chronic infection due to this virus and SV40. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 258: 1000-1002.
- Dupuis, A. P., P. P. Marra, L. D. Kramer. 2003.** Serologic evidence for West Nile virus transmission in Jamaica, West Indies. *Emerg Infect Dis.* 9: 860–863.
- Egloff, M.-P., D. Benarroch, B. Selisko, Romette, J.-L., Canard, B. 2002.** An RNA cap (nucleoside-2 ϕ -O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO Journal.* 21: 2757-2768.
- Elizondo-Quiroga, D., C. Tood Davis, I. Fernández-Salas, Escobar-López, R., Velasco Olmos, D., Soto Gastalum, L.C., Aviles-Acosta, M., Elizondo-Quiroga, A., Gonzalez-Rojas, J.I., Contreras-Cordero, J.F., Guzman, H., Travassos da Rosa, A., Blitvich, B.J., Barrett, A.D., Beaty, B.J., Tesh, R.B. 2005.** West Nile virus isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 11: 1449-1452.
- Erdélyi, K., K. Ursu, E. Ferenczi, Szeredi, L., Rátz, F., Skáre, J., Bakonyi, T. 2007.** Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7: 181-188.
- Eritja, R., C. Aranda, J. Padrós, Goula, M. 2000.** An annotated checklist and bibliography of the mosquitoes of Spain (Diptera: Culicidae). *Eur Mosq Bull.* 8: 10-18.
- Esteves, A., A. P. G. Almeida, R. P. Galao, Parreira, R., Piedade, J., Rodrigues, J.C., Sousa, C.A., Novo, M.T. 2005.** West Nile Virus in Southern Portugal, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5: 410-413.
- Estrada-Franco, J., R. Navarro-Lopez, D. Beasley, Coffey, L., Carrara, A.S., Travassos da Rosa, A., Clements, T., Wang, E., Ludwig, G., Campomanes-Cortes, A., Paz-Ramirez, P., Tesh, R.B., Barrett, A., Weaver, S.C. 2003.** West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis.* 9: 1604–1607.
- Fan, W. F., P. W. Mason. 1990.** Membrane association and secretion of the Japanese encephalitis virus NS1 protein from cells expressing NS1 cDNA. *Virology.* 177: 470-476.
- Fedele, C. G., A. Negredo, F. Molero, Sánchez-Seco, M.P., Tenorio, A. 2006.** Use of internally controlled real-time genome amplification for detection of variola virus and other orthopoxviruses infecting humans. *J Clin Microbiol.* 44: 4464-4470.

- Figuerola, J., R. Soriguer, G. Rojo, Gómez Tejedor, C., Jimenez-Clavero, M.A. 2007a.** Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis.* 13: 1915-1917.
- Figuerola, J., M. A. Jiménez-Clavero, G. Rojo, Gómez-Tejedor, C., Soriguer, R. 2007b.** Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in colonial aquatic birds in southern Spain. *Avian Pathol.* 36: 209–212.
- Filipe, A. R. 1971.** Antibodies against arboviruses in wild birds of Portugal. *Arch Gesamte Virusforsch.* 35: 395-398.
- Filipe, A. R. 1972.** Isolation in Portugal of West Nile virus from *Anopheles maculipennis* mosquitoes. *Acta Virol.* 16: 361.
- Filipe, A. R. 1974.** Serological survey for antibodies to arboviruses in the human population of Portugal. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 68: 311-314.
- Filipe, A. R. 1975.** Surveys of antibodies against arboviruses in animals of Southern Portugal. *An Inst Hig Med Trop.* 3: 267-271.
- Filipe, A. R., M. R. Pinto. 1969.** Survey for antibodies to arboviruses in serum of animals from southern Portugal. *Am J Trop Med Hyg.* 18: 423-426.
- Filipe, A. R., H. R. de Andrade. 1990.** Arboviruses in the Iberian Peninsula. *Acta Virol.* 34: 582-591.
- Filipe, A. R., M. Sobral, F. C. Campanico. 1973.** Encefalomyelitis equina por arbovírus. A propósito de uma epizootia presuntiva causada pelo vírus West Nile. *Rev Port Cien Vet.* 68: 90-101.
- Fontenille, D., M. Traore-Lamizana, J. Trouillet, Leclerc, A., Mondo, M., Ba, Y., Digoutte, J.P., Zeller, H.G. 1994.** First isolations of arboviruses from phlebotomine sand flies in West Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 5: 570-574.
- Gaidamovich, S. Y., Y. N. Cherednichenko, V. M. Zhdanov. 1978.** On the mechanism of the persistence of lymphocytic choriomeningitis virus in the continuous cell line Detroit-6. *Intervirology.* 9: 156-161.
- Garea-González, M. T., A. R. Filipe. 1977.** Antibodies to arboviruses in northwestern Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 26: 792-797.
- Gaunt, M. W., A. A. Sall, X. de Lamballerie, Falconar, A.K., Dzhivanian, T.I., Gould, E.A. 2001.** Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J. Gen. Virol.* 82: 1867–1876.
- Giladi, M., E. Metzker-Cotter, D. A. Martin, Siegman-Igra, Y., Korczyn, A.D., Rosso, R., Berger, S.A., Campbell, G.L., Lanciotti, R.S. 2001.** West Nile encephalitis in Israel, 1999: the New York connection. *Emerg Infect Dis.* 7: 659-661.
- Girard, Y. A., V. Popov, J. Wen, Han, V., Higgs, S. 2005.** Ultrastructural study of West Nile virus pathogenesis in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 42: 429–444.
- Giudice, P. D., I. Schuffenecker, C. Vandenbos, E., Zeller, H. 2004.** Human West Nile Virus, France. *Emerg Infect Dis.* 10: 1886-1886.
- Goddard, L. B., A. E. Roth, W. K. Reisen, Scott, T.W. 2003.** Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species. *J Med Entomol.* 40: 743-746.
- Gould, E. A. 2002.** Evolution of the Japanese encephalitis serocomplex viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 267: 391-404.
- Gould, E. A., X. de Lamballerie, P. M. Zlotoff, Holmes, E.C. 2003.** Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv Virus Res.* 59: 277–314.
- Gubler, D. J. 2002.** The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 33: 330-342.
- Gubler, D. J. 2007.** The Continuing Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Emerging Infections.* 45: 1039-1046.

- Gubler, D. J., G. L. Campbell, R. Nasci, Komar, N., Petersen, L., Roehrig, J.T. 2000.** West Nile virus in the United States: guidelines for detection, prevention, and control. *Viral Immunol.* 13: 469-475.
- Guirakhoo, F., F. X. Heinz, C. W. Mandl, Holzmann, H., Kunz, C. 2003.** Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *J. Gen. Virol.* 72: 1323-1329.
- Guzman, M., S. Vazquez. 2002.** Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. *Rev Cubana Med Trop.* 54: 180-188.
- Guzmán, M. G., G. Kouri. 1996.** Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 3: 621-627.
- Hall, R. A., D. J. Nisbet, K. B. Pham, Pyke, A.T., Smith, G.A., Khromykh, A.A. 2003.** DNA vaccine coding for the full-length infectious Kunjin virus RNA protects mice against the New York strain of West Nile virus. *PNAS. Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 10460-10464.
- Hamer, G. L., U. D. Kitron, J. D. Brawn, Loss, S.R., Ruiz, M.O., Goldberg, T.L., Walker, E.D. 2008.** *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. *J Med Entomol.* 45: 125-128.
- Hanna, S. L., T. C. Pierson, M. D. Sanchez, Ahmed, A.A., Murtadha, M.M., Doms, R.W. 2005.** N-linked glycosylation of west nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity. *J Virol.* 79: 13262-13274.
- Hayes, E. B., N. Komar, R. S. Nasci, Montgomery, S.P., O'Leary, D.R., Campbell, G.L. 2005a.** Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. *Emer Infect Dis.* 11: 1167-1173.
- Hayes, E. B., J. J. Sejvar, S. R. Zaki, Lanciotti, R.S., Bode, A.V., Campbell, G.L. 2005b.** Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis.* 11: 1174-1179.
- Hayes, E. B., Gubler, D.J. 2006.** West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Ann Rev Med.* 57: 181-194.
- Hayes, G. C. 2001.** West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 951: 25-37.
- Heinz, F. X., S. L. Allison. 2000.** Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv Virus Res.* 55: 231-269.
- Henchal, E. A., J. R. Putnak. 1990.** The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 3: 376-396.
- Hindiyeh, M., L. M. Shulman, E. Mendelson, Weiss, L., Grossman, Z., Bin, H. 2001.** Isolation and characterization of West Nile Virus from the blood of viremic patients during the outbreak in Israel. *Emerg Infect Dis.* 7: 748-750.
- Höfle, U., J. M. Blanco, E. Crespo, Naranjo, V., Jiménez-Clavero, M.A., Sánchez, A., de la Fuente, J., Gortazar, C. 2007.** West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Vet Microbiol.* 129: 171-178.
- Hoshino, K., H. Isawa, Y. Tsuda, Yano, K., Sasaki, T., Yuda, M., Takasaki, T., Kobayashi, M., Sawabe, K. 2007.** Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology.* 359: 405-414.
- Huang, C. Y., S. J. Silengo, M. C. Whiteman, Kinney, R.M. 2005.** Chimeric dengue 2 PDK-53/West Nile NY99 viruses retain the phenotypic attenuation markers of the candidate PDK-53 vaccine virus and protect mice against lethal challenge with West Nile virus. *J Virol.* 79: 7300-7310.
- Hubalek, Z. 2000.** European experience with the West Nile virus ecology and epidemiology: could it be relevant for the New World? *Viral Immunol.* 13: 415-426.
- Hubalek, Z., J. Halouzka. 1999.** West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis.* 5: 643-650.
- Hubalek, Z., J. Halouzka, Z. Juricova, Sebesta, O. 1998.** First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virol.* 42: 119-120.

- Jerzak, G., K. A. Bernard, L. D. Kramer, Ebel, G.D. 2005.** Genetic variation in West Nile virus from naturally infected mosquitoes and birds suggests quasispecies structure and strong purifying selection. *Journal of General Virology*. 86: 2175–2183.
- Jiménez-Clavero, M. A., M. Agüero, G. Rojo, Gómez-Tejedor, C. 2006.** A new fluorogenic real-time RT-PCR assay for detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile viruses. *J Vet Diagn Invest*. 18: 459-462.
- Jiménez-Clavero, M. A., C. Gómez-Tejedor, G. Rojo, Soriguer, R., Figuerola, J. 2007.** Sero-survey of West Nile virus antibodies in equids and bovids in Spain. *Vet. Rec*. 161: 212.
- Jiménez-Clavero, M. A., E. Sotelo, J. Fernandez-Pinero, Llorente, F., Blanco, J.M., Rodríguez-Ramos, J., Perez-Ramirez, E., Höfle, U. 2008.** West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007. *Emerg Infect Dis*. 14: 1489-1491.
- Jordan, I., T. Briese, N. Fischer, Lau, J.Y., Lipkin, W.I. 2000.** Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis*. 182: 1214-1217.
- Jupp, P. G. 2001.** The ecology of West Nile virus in South Africa and the occurrence of outbreaks in humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 951: 143-152.
- Kaptoul, D., P. F. Viladrich, C. Domingo, J. Niubó, S. Martínez-Yélamos, F. de Ory, T. Tenorio. 2006.** West Nile virus in Spain: Report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*.
- Karabatsos, N. 1985.** International Catalogue of Arboviruses, including certain other viruses of vertebrates. *Am J Trop Med Hyg.*: 84-86.
- Karaca, K., R. Bowen, L. E. Austgen, Teehee, M., Siger, L., Grosenbaugh, D., Loosemore, L., Audonnet, J.C., Nordgren, R., Minke, J.M. 2005.** Recombinant canarypox vectored West Nile virus (WNV) vaccine protects dogs and cats against a mosquito WNV challenge. *Vaccine*. 23: 3808-3813.
- Khairallah, M., S. Ben Yahia, A. Ladjimi, Zeghidi, H., Ben Romdhane F., Besbes, L., Zaouali, S., Messaoud, R. 2004.** Chorioretinal involvement in patients with West Nile virus infection. *Ophthalmology*. 111: 2065-2070.
- Khromykh, A. A., P. L. Sedlak, E. G. Westaway. 2000.** cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. *J Virol*. 74: 3253-3263.
- Khromykh, A. A., A. N. Varnavski, P. L. Sedlak, Westaway, E.G. 2001.** Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J Virol*. 75: 4633-4640.
- Kilpatrick, A. M. 2005.** West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerg Infect Dis*. 11: 425–429.
- Klenerman, P., H. Hengartner, R. M. Zinkernagel. 1997.** A non-retroviral RNA virus persists in DNA form. *Nature*. 390: 298-301.
- Komar, N. 2003.** West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res*. 61: 185-234.
- Komar, N., G. G. Clark. 2006.** West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica*. 19: 112-117.
- Komar, N., R. Lanciotti, R. Bowen, Langevin, S., Bunning, M. 2002.** Detection of West Nile virus in oral and cloacal swabs collected from bird carcasses. *Emerg Infect Dis*. 8: 741-742.
- Komar, N., S. Langevin, S. Hinten, Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R., Bunning, M. 2003a.** Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis*. 9: 311-322.
- Komar, O., M. B. Robbins, K. Klenk, Blitvich, B.J., Marlenee, N.L., Burkhalter, K.L. 2003b.** West Nile virus transmission in resident birds, Dominican Republic. *Emerg Infect Dis*. 9: 1299–1302.
- Kramer, L. D., L. M. Styer, G. D. Ebel. 2008.** A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol*. 53: 61-81.

- Kumar, S., K. Tamura, M. Nei. 2004.** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5: 150-163.
- Kuno, G., G.-J. J. Chang. 2005.** Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. *Clinical Microbiology.* 18: 608–637.
- Kuno, G., G. J. Chang, K. R. Tsuchiya, Karabatsos, N., Cropp, C.B. 1998.** Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.* 72: 73–83.
- Lanciotti, R. S., J. T. Roehrig, V. Deubel, Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, B., Volpe, K.E., Crabtree, M.B., Scherret, J.H., Hall, R.A., MacKenzie, J.S., Cropp, C.B., Panigrahy, B., Ostlund, E., Schmitt, B., Malkinson, M., Banet, C., Weissman, J., Komar, N., Savage, H.M., Stone, W., McNamara, T., Gubler, D.J. 1999.** Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science.* 286: 2333-2337.
- Lanciotti, R. S., A. J. Kerst, R. S. Nasci, Godsey, M.S., Mitchell, C.J., Savage, H.M., Komar, N., Panella, N.A., Allen, B.C., Volpe, K.E., Davis, B.S., Roehrig, J.T. 2000.** Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol.* 38: 4066-4071.
- Ledizet, M., K. Kar, H. G. Foellmer, Wang, T., Bushmich, S.L., Anderson, J.F., Fikrig, E., Koski, R.A. 2005.** A recombinant envelope protein vaccine against West Nile virus. 23: 3915-3924.
- Lieberman, M. M., D. E. Clements, S. Ogata, Wang, G., Corpuz, G., Wong, T., Martyak, T., Gilson, L., Coller, B.A., Leung, J., Watts, D.M., Tesh, R.B., Siirin, M., Travassos da Rosa, A., Humphreys, T., Weeks-Levy, C. 2007.** Preparation and immunogenic properties of a recombinant West Nile subunit vaccine. *Vaccine.* 3.
- Lindenbach, B. D., C. M. Rice. 1999.** Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol.* 73: 4611-4621.
- Linke, S., H. Ellerbrok, M. Niedrig, Nitsche, A., Pauli, G. 2007.** Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods.* 146: 355-358.
- López, G., M. A. Jiménez-Clavero, C. G. Tejedor, Soriguer, R., Figuerola, J. 2008.** Prevalence of West Nile Virus Neutralizing Antibodies in Spain Is Related to the Behavior of Migratory Birds. *Vector Borne Zoonotic Dis.*
- Lozano, A., A. R. Filipe. 1998.** Antibodies against the West Nile virus and other arthropod-transmitted viruses in the Ebro Delta region. *Rev Esp Salud Publica.* 72: 245-250.
- Luo, D., T. Xu, C. Hunke, Grüber, G., Vasudevan, S.G., Lescar, J. 2008.** Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol.* 82: 173-183.
- Lvov, D. K., A. M. Butenko, V. L. Gromashevsky, Larichev, V.F., Gaidamovich, S.Y., Vyshemirsky, O.I., Zhukov, A.N., Lazorenko, V.V., Salko, V.N., Kovtunov, A.I., Galimzyanov, K.M., Platonov, A.E., Morozova, T.N., Khutoretskaya, N.V., Shishkina, E.O., Skvortsova, T.M. 2000.** Isolation of two strains of West Nile virus during an outbreak in southern Russia, 1999. *Emerg Infect Dis.* 6: 373-376.
- Lvov, D. K., A. M. Butenko, V. L. Gromashevsky, Kovtunov, A.I., Prilipov, A.G., Kinney, R., Aristova, V.A., Dzharkenov, A.F., Samokhvalov, E.I. 2004.** West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch Virol.* 18: 85–96.
- Mackenzie, J. S., D. J. Gubler, L. R. Petersen. 2004.** Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature Medicine.* 10: 98-109.
- Malik, H. S., S. Henikoff, T. H. Eickbush. 2000.** Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Res.* 10: 1307-1318.

- Marfin, A. A., D. J. Gubler. 2001.** West Nile encephalitis: an emerging disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 33: 1713-1719.
- Marin, M. S., P. M. Zanotto, G. De A., T.S., Gould, E.A. 1995.** Phylogeny of TYU, SRE, and CFA virus: different evolutionary rates in the genus *Flavivirus*. *Virology.* 206: 1133–1139.
- Maritza, P., M. G. Guzmán, R. Fernández, Llop, A., Dickinson, F.O., Pérez, D., Cruz, R., González, T., Estévez, G., González, H., Santos, P., Kourí, G., Andonova, M., Lindsay, R., Artsob, H., Drebot, M. 2006.** West Nile Virus Infection in Humans and Horses, Cuba. *Emer Infect Dis.* 12: 1022-1024.
- Mason, P. W., A. V. Shustov, I. Frolov. 2006.** Production and characterization of vaccines based on flaviviruses defective in replication. *Virology.* 351: 432-443.
- Mattar, S., E. Edwards, J. Laguado, Gonzalez, M., Alvarez, J., Komar, N. 2005.** West Nile Virus antibodies in Colombian Horses. *Emerg Infect Dis.* 11: 1497-1498.
- May, F. J., M. Lobigs, E. Lee, Gendle, D.J., Mackenzie, J.S., Broom, A.K., Conlan, J.V., Hall, R.A. 2006.** Biological, antigenic and phylogenetic characterization of the flavivirus Alfuy. *Journal of Clinical Virology* 87: 329–337.
- McLean, R. G., S. R. Ubico, D. Bourne, Komar, N. 2002.** West Nile virus in livestock and wildlife. *Curr Top Microbiol Immunol.* 267: 271-308.
- McMinn, P. C. 1997.** The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *J Gen Virol.*: 11.
- Mehlhop, E., M. S. Diamond. 2008.** The molecular basis of antibody protection against West Nile virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 317: 125-153.
- Men, R., M. Bray, D. Clark, Chanock, R.M., Lai, C.J. 1996.** Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J. Virol.* 70: 3930-3937.
- Mercado-Curiel, R. F., H. A. Esquinca-Avilés, R. Tovar, Díaz-Badillo, A., Camacho-Nuez, M., Muñoz, M de L. 2006.** The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol.* 6: 1-10.
- Miller, B. R., R. S. Nasci, M. S. Godsey, Savage, H.M., Lutwama, J.J., Lanciotti, R.S., Peters, C.J. 2000.** First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 62: 240-246.
- Molaei, G., J. Oliver, T. G. Andreadis, Armstrong, P.M., Howard, J.J. 2006.** Molecular identification of blood-meal sources in *Culiseta melanura* and *Culiseta morsitans* from an endemic focus of eastern equine encephalitis virus in New York. *Am J Trop Med Hyg.* 75: 1140-1147.
- Monath, T. P., F. X. Heinz. 1996.** Flaviviruses. In *Fields Virology*, 3rd edn. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, NY: Lippincott–Raven: 961-1034.
- Monath, T. P., J. Liu, N. Kanasa-Thanan, Myers, G.A., Nichols, R., Deary, A., McCarthy, K., Johnson, C., Ermak, T., Shin, S., Arroyo, J., Guirakhoo, F., Kennedy, J.S., Ennis, F.A., Green, S., Bedford, P. 2006.** A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *PNAS.* 103: 6694-6699.
- Morales, M. A., M. Barrandeguy, C. Fabbri, Garcia, J.B., Vissani, A., Trono, K., Gutierrez, G., Pigretti, S., Menchaca, H., Garrido, N., Taylor, N., Fernandez, F., Levis, S., Enría, D. 2006.** West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emer Infect Dis.* 12: 1559-1561.
- Morrey, J. D., D. F. Smee, R. W. Sidwell, Tseng, C. 2002.** Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus. *Antiviral Res.* 55: 107-116.

- Morrey, J. D., C. W. Day, J. G. Julander, Blatt, L.M, Smee, D.F, Sidwell, R.W. 2004.** Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antivir Chem Chemother.* 15: 101-109.
- Mukhopadhyay, S., R. J. Kuhn, M. G. Rossmann. 2005.** A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature.* 3: 13-22.
- Murgue, B., S. Murri, H. Triki, Deubel, V., Zeller, H. 2001a.** West Nile in the Mediterranean Basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci.* 951: 117-126.
- Murgue, B., S. Murri, S. Zientara, Durand, B., Durand, J.P., Zeller, H. 2001b.** West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: The return after 35 years. *Emerg Infect Dis.* 7: 692-696.
- Murgue, B., Zeller, H., Deubel, V. 2002.** The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr Top Microbiol Immunol.* 267: 195-221.
- Nasci, R. S., H. M. Savage, D. J. White, Miller, J.R., Cropp, B.C., Godsey, M.S., Kerst, A.J., Bennett, P., Gottfried, K., Lanciotti, R.S. 2001.** West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis.* 7: 742-744.
- Nasci, R. S., N. Komar, A. A. Marfin, Ludwig, G.V., Kramer, L.D., Daniels, T.J., Falco, R.C., Campbell, S.R., Brookes, K., Gottfried, K.L., Burkhalter, K.L., Aspen, S.E., Kerst, A.J., Lanciotti, R.S., Moore, C.G. 2002.** Detection of West Nile virus-infected mosquitoes and seropositive juvenile birds in the vicinity of virus-positive dead birds. *Am J Trop Med Hyg.* 67: 492-496.
- Ng, T., D. Hathaway, N. Jennings, Champ, D., Chiang, Y.W., Chu, H.J. 2003.** Equine vaccine for West Nile virus. *Dev Biol.* 114: 221-227.
- Nowak, T., P. M. Färber, G. Wengler, Wengler, G. 1989.** Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the *in vitro* translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology.* 169: 365-376.
- O'Leary, D. R., R. S. Nasci, G. L. Campbell, Marfin, A.A. 2002.** West Nile virus activity—United States, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 51: 497-501.
- Paddock, C. D., W. L. Nicholson, J. Bhatnagar, Goldsmith, C.S., Greer, P.W., Hayes, E.B., Risko, J.A., Henderson, C., Blackmore, C.G., Lanciotti, R.S., Campbell, G.L., Zaki, S.R. 2006.** Fatal Hemorrhagic Fever Caused by West Nile Virus in the United States. *Clin Infect Dis.* 42: 1527-1535.
- Parrish, C. R., W. S. Woo, P. J. Wright. 1991.** Expression of the NS1 gene of dengue virus type 2 using vaccinia virus. Dimerisation of the NS1 glycoprotein. *Arch Virol.* 117: 279-286.
- Petersen, L. R., J. T. Roehrig. 2001.** West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg Infect Dis.* 7: 611-614.
- Platonov, A. E., G. A. Shipulin, O. Y. Shipulina, Tyutyunnik, E.N., Frolochkina, T.I., Lanciotti, R.S., Yazyshina, S., Platonova, O.V., Obukhov, I.L., Zhukov, A.N., Vengerov, Y.Y., Pokrovskii, V.I. 2001.** Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis.* 7: 128-132.
- Pletnev, A. G., R. Putnak, J. Speicher, Wagar, E.J., Vaughn, D.W. 2002.** West Nile virus/dengue type 4 virus chimeras that are reduced in neurovirulence and peripheral virulence without loss of immunogenicity or protective efficacy. *PNAS.* 99: 3036-3041.
- Pletnev, A. G., Claire, M.S., Elkins, R., Speicher, J., Murphy, B.R., Chanock, R.M. 2003.** Molecularly engineered live-attenuated chimeric West Nile/dengue virus vaccines protect rhesus monkeys from West Nile virus. *Virology.* 314: 190-195.
- Posada, D. 2003.** Using MODELTEST and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. *Curr Protoc Bioinformatics.*: Unit 6.5.
- Posada, D. 2006.** ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Res.* 34: 700-703.

- Price, J. L. 1978.** Isolation of Rio Bravo and a hitherto undescribed agent, Tamana bat virus, from insectivorous bats in Trinidad, with serological evidence of infection in bats and man. *Am J Trop Med Hyg.* 27: 153–161.
- Prikhod'ko, G. G., E. A. Prikhod'ko, A. G. Pletnev, Cohen, J.I. 2002.** Langat Flavivirus Protease NS3 Binds Caspase-8 and Induces Apoptosis. *J Virol.* 76: 5701–5710.
- Proutski, V., T. S. Gritsun, E. A. Gould, Holmes, E.C. 1999.** Biological consequences of deletions within the 3'-untranslated region of flaviviruses may be due to rearrangements of RNA secondary structure. *Virus Res.* 64: 107-123.
- Pujol, E., E. F. Fuertes, J. Saavedra, Ruiz, S., Díaz, A., Vázquez, I., Domingo, C., Figuerola, J., Soriguer, R., Guillén, J. 2004.** Seroprevalencia frente al virus West Nile en una población centinela. *Avances en Enfermedades Infecciosas:* 29.
- Quirin, R., M. Salas, S. Zientara, Zeller, H., Labie, J., Murri, S., Lefrancois, T., Petitclerc, M., Martinez, D. 2004.** First serological occurrence of West Nile virus in Guadeloupe. *Emerg Infect Dis.* 10: 706-708.
- Rappole, J. H., S. R. Derrickson, Z. Hubalek. 2000.** Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis.* 6: 319-328.
- Reisen, W., A. C. Brault. 2007.** West Nile virus in North America: perspectives on epidemiology and intervention. *Pest Manag Sci.* 63: 641-646.
- Reisen, W. K., Y. Fang, V. M. Martinez. 2005.** Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St Louis encephalitis virus transmission. *J Med Entomol.* 42: 367–375.
- Reisen, W. K., Fang, Y., Lothrop, H.D., Martinez, V.M., Wilson, J., Oconnor, P., Carney, R., Cahoon-Young, B., Shafii, M., Brault, A.C. 2006a.** Overwintering of West Nile virus in Southern California. *J Med Entomol.* 43: 344-355.
- Reisen, W. K., Fang, Y., Martinez, V.M. 2006b.** Effects of temperature on the transmission of west nile virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 43: 309-317.
- Rey, F. A., F. X. Heinz, C. Mandl, Kunz, C., Harrison, S.C. 1995.** The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature.* 375: 291-298.
- Rice, C. M. 1996.** Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Virology.*: 931-960.
- Rice, C. M., J. H. Strauss. 1990.** Production of flavivirus polypeptides by proteolytic processing. *Semin Virol.* 1: 357–367.
- Rice, C. M., E. M. Lenches, S. R. Eddy, Shin, S.J., Sheets, R.L., Strauss, J.H. 1985.** Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science.* 23: 726-733.
- Roehrig, J. T., D. Nash, B. Maldin, Labowitz, A., Martin, D.A., Lanciotti, R.S., Campbell, G.L. 2003.** Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin m antibody in confirmed west nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis.* 9: 376-379.
- Roiz, D., R. Eritja, R. Melero-Alcibar, Molina, R., Marquès, E., Ruiz, S., Escosa, R., Aranda, C., Lucientes, J. 2007.** Distribución de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae) en España. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa.* 40: 523–526.
- Salas-Benito, J. S., R. M. del Angel. 1997.** Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *J Virol.* 71: 7246-7252.
- Samina, I., Y. Khinich, M. Simanov, Malkinson, M. 2005.** An inactivated West Nile virus vaccine for domestic geese-efficacy study and a summary of 4 years of field application. *Vaccine.* 23: 4955-4958.
- Sánchez-Seco, M. P., J. M. Navarro. 2005.** Infecciones por el virus Toscana, el virus del Nilo Occidental y otros arbovirus de interés en Europa. *Emferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23: 560-568.
- Sánchez-Seco, M. P., Rosario, D., Domingo, C., Hernandez, L., Valdes, K., Guzmán, M.G., Tenorio A. 2005.** Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using

- degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods*. 126: 101-109.
- Sanchis-Bayarri Vaillant, V. 1974.** Contribución al estudio de la serología de las infecciones por arbovirus. *Hospital General*. 14: 417-424.
- Sang, R. C., A. Gichogo, J. Gachoya, Dunster, M.D., Ofula, V., Hunt, A.R., Crabtree, M.B., Miller, B.R., Dunster, L.M. 2003.** Isolation of a new flavivirus related to cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Arch. Virol*. 148: 1085–1093.
- Savage, H. M., C. Ceianu, G. Nicolescu, Karabatsos, N., Lanciotti, R., Vladimirescu, A., Laiv, L., Ungureanu, A., Romanca, C., Tsai, T.F. 1999.** Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 61: 600-611.
- Scherret, J. H., M. Poidinger, J. S. Mackenzie, Broom, A.K., Deubel, V., Lipkin, W.I., Briese, T., Gould, E.A., Hall, R.A. 2001.** The Relationships between West Nile and Kunjin Viruses. *Emerg Infect Dis*. 7: 697-705.
- Schuffenecker, I., C. N. Peyrefitte, M. el Harrak, Murri, S., Leblond, A., Zeller, H.G. 2005.** West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis*. 11: 306-309.
- Schuler, G. D., S. F. Altschul, D. J. Lipman. 1991.** A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins*. 9: 180-190.
- Sejvar, J. J., M. B. Haddad, B. C. Tierney, Campbell, G.L., Marfin, A.A., Van Gerpen, J.A., Fleischauer, A., Leis, A.A., Stokic, D.S., Petersen, L.R. 2003.** Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA*. 290: 511-515.
- Seregin, A., R. Nistler, V. Borisevich, Yamshchikov, G., Chaporgina, E., Kwok, C.W., Yamshchikov, V. 2006.** Immunogenicity of West Nile virus infectious DNA and its noninfectious derivatives. *Virology*. 356: 115-125.
- Shi, P.-Y., E. B. Kauffman, P. Ren, Felton, A., Tai, J.H., Alan, P., Dupuis II, A.P., Jones, S.A., Ngo, K.A., Nicholas, D.C., Maffei, J., Ebel, G.D., Bernard, K.A., Kramer, L.D. 2001.** Highthroughput detection of West Nile virus RNA. *J Clin Microbiol*. 39: 1264–1271.
- Shirato, K., H. Miyoshi, H. Kariwa, Takashima, I. 2005.** Detection of West Nile virus and Japanese encephalitis virus using real-time PCR with a probe common to both viruses. *J Virol Methods*. 126: 119–125.
- Smithburn, K. C., T. P. Hughes, A. W. Burke, Paul, J.H. 1940.** A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg*. 20: 471-492.
- Stadler, K., S. L. Allison, J. Schalich, Heinz, F.X. 1997.** Proteolytic activation of tickborne encephalitis virus by furin. *J. Virol*. 71: 8475–8481.
- Steele, K. E., M. J. Linn, R. J. Schoepp, Komar, N., Geisbert, T.W., Manduca, R.M., Calle, P.P., Raphael, B.L., Clippinger, T.L., Larsen, T., Smith, J., Lanciotti, R.S., Panella, N.A., McNamara, T.S. 2000.** Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Vet Pathol*. 37: 208 –224.
- Steinman, A., C. Banet, G. A. Sutton, Yadin, H., Hadar, S., Brill, A. 2002.** Clinical signs of West Nile virus encephalomyelitis in horses during the outbreak in Israel in 2000. *Vet. Rec*. 151: 47–49.
- Stiasny, K., F. X. Heinz. 2004.** Effect of membrane curvature-modifying lipids on membrane fusion by tick-borne encephalitis virus. *J Virol*. 78: 8536-8542.
- Strauss, J. H., E. G. Strauss. 2002.** Virus and human diseases. Academic Press: 33-104.
- Tajima, S., T. Takasakia, S. Matsunob, Nakayamaa, M., Kuranea, I. 2005.** Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology*. 332: 38–44.
- Tang, Y., C. A. Hapip, B. Liu, Fang, C.T. 2006.** Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *J Clin Virol*. 36: 177–182.

- Taylor, R. M., T. H. Work, H. S. Hurlbut, F. Rizk. 1956.** A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 5: 579.
- Terzian, C., A. Pélisson, A. Bucheton. 2001.** Evolution and phylogeny of insect endogenous retroviruses. *BMC Evolutionary Biology.* 1.
- Tesh, R. B., A. P. Travassos da Rosa, H. Guzman, Araujo, T.P., Xiao, S.Y. 2002.** Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerg Infect Dis.* 8: 245-251.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997.** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Trock, S. C., B. J. Meade, A. L. Glaser, Ostlund, E.N., Lanciotti, R.S., Cropp, B.C., Kulasekera, V., Kramer, L.D., Komar, N. 2001.** West Nile virus outbreak among horses in New York State, 1999 and 2000. *Emerg Infect Dis.* 7: 745-747.
- Tsai, T. F., F. Popovici, C. Cernescu, Campbell, G.L., Nedelcu, N.I. 1998.** West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet.* 352: 767-771.
- Uchil, P. D., V. Satchidanandam. 2003.** Characterization of RNA síntesis, replication mechanism, and in vitro RNA-dependent RNA polymerase activity of Japanese encephalitis virus. *Virology.* 307: 358-371.
- Uchil, P. D., Kumar, A.V.A., Satchidanandam, V. 2006.** Nuclear localization of flavivirus RNA síntesis in infected cells. *J Virol.* 80: 5451-5464.
- Vallès, X., F. Sánchez. 2000.** West Nile virus: el virus de la fiebre del Oeste del Nilo. *Enf Emerg.* 2: 232-238.
- van der Meulen, K. M., M. B. Pensaert, H. J. Nauwynck. 2005.** West Nile virus in the vertebrate world. *Arch Virol.* 150: 637-657.
- Vanlandingham, D. L., B. S. Schneider, K. Klingler, Fair, J., Beasley, D., Huang, J., Hamilton, P., Higgs, S. 2004.** Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction quantification of West Nile virus transmitted by *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Am J Trop Med Hyg.* 71: 120-123.
- Wang, T., T. Town, L. Alexopoulou, Anderson, J.F., Fikrig, E., Flavell, R.A. 2004.** Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10: 1366 –1372.
- Weaver, S. C., A. D. Barrett. 2004.** Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol.* 2: 789-801.
- Weissenböck, H., J. Kolodziejek, A. Url, Lussy, H., Rebel-Bauder, B., Nowotny, N. 2002.** Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerging Infect. Dis.* 8: 652–656.
- Wengler, G., G. Wengler, T. Nowak, Castle, E. 1990.** Description of a procedure which allows isolation of viral nonstructural proteins from BHK vertebrate cells infected with the West Nile flavivirus in a state which allows their direct chemical characterization. *Virology.* 177: 795-801.
- Winkler, G., S. E. Maxwell, C. Rueemler, Stollar, V. 1989.** Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology.* 171: 302-305.
- Yamshchikov, G., V. Borisevich, A. Seregin, Chaporgina, E., Mishina, M., Mishin, V., Kwok, C.W., Yamshchikov, V. 2004.** An attenuated West Nile prototype virus is highly immunogenic and protects against the deadly NY99 strain: a candidate for live WN vaccine development. *Virology.* 330: 304-312.
- Zanotto, P. M. D. A., E. A. Gould, G. F. Gao, Harvey, P.H., Holmes, E.C. 1996.** Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 548-553.

- Zeller, H. G., I. Schuffenecker. 2004.** West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 147-156.
- Zhdanov, V. M. 1975.** Integration of viral genomes. *Nature.* 256: 471-473.
- Zhdanov, V. M., M. I. Parfanovich. 1974.** Integration of measles virus nucleic acid into the cell genome. *Arch Gesamte Virusforsch.* 45: 225-234.
- Zhdanov, V. M., N. B. Azadova. 1976.** Integration and transfection of an arbovirus by mammalian cells. *Mol Biol.* 10: 1296-1302.

ANEXO

Secuencias utilizadas en los análisis de detección de 87pb del gen NS5					
Abreviatura virus	Nº acceso	Abreviatura virus	Nº acceso	Abreviatura virus	Nº acceso
KRV SR82	NC005064	TBV STBV SREV	AF013403	MBV KVG KOKV	AF013383
KRV SR75	EU074051	TBV STBV TYUV	AF013410	MBV NVG NTAV	AF013392
KRV ARG	DQ335465	MBV JEG KOUV	AF013384	MBV DVG DENV1	AY145121
CFAV	NC001564	MBV JEG JEV	NC001437	MBV DVG DENV2	AY744150
CFA ARG	DQ335466	MBV JEG MVEV	NC000943	MBV DVG DENV3	AY648961
CFA 310ARG	DQ335467	MBV JEG USEV	AF161266	MBV DVG DENV4	AF326825
CFA H984	EU074055	MBV JEG USUV	AF013412	MBV DVG KEDV	AF013382
CFA RioPiedras	EU074056	MBV JEG WNV	AY532665	MBV AVG AROAV	AF013362
CFA Culebra	DQ181509	MBV JEG WNV	AF260968	MBV AVG IGUV	AF013375
Aedes aegyptiA20	AY347953	MBV JEG WNV	DQ318020	UNKV EBG ENTV	AF013373
Culexflavivirus_Tokio	AB262759	MBV JEG CPCV	AF013367	UNKV EBG YOKV	AF013414
TSF TABV	NC003996	MBV JEG SLEV	AF013416	UNKV MODG APOIV	NC003676
TBV MTBV GGYV	AF013374	MBV SVG SPOV	AF013406	UNKV MODG CRV	AF013370
TBV MTBV KADV	AF013380	MBV SVG ZIKV	AF013415	UNKV MODG JUTV	AF013379
TBV MTBV KFDV	AF013385	MBV YFG BANV	L40951	UNKV MODG MODV	NC003635
TBV MTBV LGTV	NC003690	MBV YFG BOUV	AF013364	UNKV MODG SVV	AF013401
TBV MTBV OHFV	NC005062	MBV YFG EHV	AF013372	UNKV RBG BBV	AF013365
TBV MTBV POWV	NC003687	MBV YFG JUGV	AF013378	UNKV RBG CIV	AF013368
TBV MTBV RFV	AF013398	MBV YFG YFV	NC002031	UNKV RBG DBV	AF013371
TBV MTBV TBEV	NC001672	MBV YFG SABV	AF013395	UNKV RBG MMLV	AF013388
TBV MTBV LIV	NC001809	MBV YFG SEPV	AF013404	UNKV RBG PPBV	AF013394
TBV STBV MEAV	AF013386	MBV YFG UGSV	AF013411	UNKV RBG RBV	NC003675

Secuencias utilizadas en los análisis de filogenia de 1036pb del gen NS5					
Abreviatura virus	Nº acceso	Abreviatura virus	Nº acceso	Abreviatura virus	Nº acceso
KRV SR75	EU074051	MBV AVG BSQV	AF013366	MBV JEG SLEV	NC007580
CFAV	M91671	MBV AVG IGUV	AF013375	MBV JEG YAOV	AF013413
CFA ARG	DQ335466	MBV DVG DENV1	AY145121	MBV JEG USUV	AF013412
Culexflavivirus_Tokio	AB262759	MBV DVG DENV2	AF119661	MBV YFG EHV	AF013372
TSF TABV	NC003996	MBV DVG DENV3	AF100466	MBV YFG JUGV	AF013378
TBV MTBV GGYV	AF013374	MBV DVG DENV4	AY776330	MBV YFG YFV	NC002031
TBV MTBV GGYV	DQ235153	MBV DVG KEDV	AF013382	MBV YFG BANV	L40951
TBV MTBV KADV	AF013380	MBV KVG STRV	AF013407	MBV YFG BOUV	AF013364
TBV MTBV KFDV	AF013385	MBV KVG KOKV	AF013383	MBV YFG SABV	AF013400
TBV MTBV KFDV	AY323490	MBV NVG NTAV	AF013392	MBV YFG POTV	AF013395
TBV MTBV KFDV	AF331718	MBV NVG BAGV	AF013363	MBV YFG UGSV	AF013411
TBV MTBV LGTV	NC003690	MBV NVG ROCV	AF013397	MBV YFG SEPV	AY632543
TBV MTBV OHFV	NC005062	MBV NVG ILHV	AF013376	UNKV EBG ENTV	AF013373
TBV MTBV RFV	AF013398	MBV NVG TMUV	AB110489	UNKV EBG YOKV	AF013414
TBV MTBV TBEV	DQ989336	MBV NVG TMUV	AB026994	UNKV EBG SOKV	AF013405
TBV MTBV TBEV	NC001672	MBV NVG ITV	AF013377	UNKV MODG APOIV	AF160193
TBV MTBV TBEV	DQ235151	MBV SVG SPOV	AF013406	UNKV MODG CRV	AF013370
TBV MTBV TBEV	AF013391	MBV SVG ZIKV	AF013415	UNKV MODG MODV	AF013387
TBV MTBV LIV	NC001809	MBV JEG KOUV	AF013384	UNKV MODG VPV	AF013402
TBV MTBV POWV	AF311056	MBV JEG JEV	AB241119	UNKV MODG SVV	AF013401
TBV MTBV RFV	AF013381	MBV JEG MVEV	AF013389	UNKV RBG BBV	AF013365
TBV MTBV RSS	AF013399	MBV JEG ALFV	AF013360	UNKV RBG CIV	AF013368
TBV MTBV SSEV	DQ235152	MBV JEG WNV804994	DQ256376	UNKV RBG DBV	AF013371
TBV STBV MEAV	AF013386	MBV JEG WNV804994	AY765264	UNKV RBG MMLV	AF013388
TBV STBV SREV	AF013403	MBV JEG WNV804994	AY277251	UNKV RBG PPBV	AF013394
TBV STBV TYUV	AF013410	MBV JEG WNV804994	DQ318020	UNKV RBG RBV	AF144692
MBV AVG AROAV	AF013362	MBV JEG WNV NY99	AF202541	UNKV RBG BCV	AF013369
MBV AVG NJLV	AF013390	MBV JEG CPCV	AF013367		

Secuencias utilizadas en los análisis de filogenia de WNV

Abreviatura virus	Nº acceso	Abreviatura virus	Nº acceso
MBV_JEG_JEV	NC001437	MBV_JEG_WNVTX03	DQ164199
MBV_JEG_USUV	NC006551	MBV_JEG_WNVCO03	DQ164203
MBV_JEG_WNV804994	DQ256376	MBV_JEG_WNVTX02	DQ164205
MBV_JEG_WNV Rab97_103	AY765264	MBV_JEG_WNVHungary03	DQ118127
MBV_JEG_WNVLEIVKrnd88_190	AY277251	MBV_JEG_WNVFDA03	DQ005530
MBV_JEG_WNVArB3573	DQ318020	MBV_JEG_WNV	AF533540
MBV_JEG_WNVNY99	AF202541	MBV_JEG_WNVVAZ04	DQ164201
MBV_JEG_WNVAnMg798	DQ176636	MBV_JEG_WNVIN02	DQ164200
MBV_JEG_WNV Sarafend	AY688948	MBV_JEG_WNVCO03	DQ164204
MBV_JEG_WNVSPU116/89	EF429197	MBV_JEG_WNNY99	DQ211652
MBV_JEG_WNVSA381/00	EF429199	MBV_JEG_WNVNY99eqhs	AF260967
MBV_JEG_WNVSA93/01	EF429198	MBV_JEG_WNVEg101	AF260968
MBV_JEG_WNVB956	AY532665	MBV_JEG_WNVRO97_50	AF260969
MBV_JEG_WNVH442	EF429200	MBV_JEG_WNVGA02	DQ164197
MBV_JEG_WNVFCG	M12294	MBV_JEG_WNV0H02	DQ164202
MBV_JEG_WNVArD76104	DQ318019	MBV_JEG_WNVTX04Harris	DQ164206
MBV_JEG_WNVHungary04	DQ116961	MBV_JEG_WNVNY99382_99	AF196835
MBV_JEG_KUNVpAKUN	AY274505	MBV_JEG_WNVMex03	AY660002
MBV_JEG_WNVLEIVVlg99_27889	AY277252	MBV_JEG_WNV385_99	AY842931
MBV_JEG_WNVItaly98	AF404757	MBV_JEG_WNVARC10	AY795965
MBV_JEG_WNVNY03	DQ164192	MBV_JEG_WNVTV8533	AY289214
MBV_JEG_WNVNY03	DQ164188	MBV_JEG_WNVUSA	AY646354
MBV_JEG_WNVLCA_04	DQ080059	MBV_JEG_WNV EthAn4766	AY603654
MBV_JEG_WNV Bird1171	AY712946	MBV_JEG_WNVIS98STD	AF481864
MBV_JEG_WNV Bird1153	AY712945	MBV_JEG_WNVMD00crow265	AF404753
MBV_JEG_WNVNY03Suffolk	DQ164190	MBV_JEG_WNVNJ00MQ5488	AF404754
MBV_JEG_WNVNY00_3356	AF4047	MBV_JEG_WNVNY003282	AF404755
MBV_JEG_WNVNY03 Albany	DQ164189	MBV_JEG_WNVNY003356	AF404756
MBV_JEG_WNV	AB185914	MBV_JEG_WNVLEIVVlg9927889	AY277252
MBV_JEG_WNVBAZ03_1681	DQ080052	MBV_JEG_WNV Ast99901	AY278441
MBV_JEG_WNV	AB185917	MBV_JEG_WNVLEIVVlg0027924	AY278442
MBV_JEG_WNV385_99	AY848696	MBV_JEG_WNVChin01	AY490240
MBV_JEG_WNVCAZ03_1799	DQ080053	MBV_JEG_WNV Bird1461	AY712947
MBV_JEG_WNVTX02	DQ164205	MBV_JEG_WNV Mosquitov4369	AY712948
MBV_JEG_WNVNY03Chautauqua	DQ164191	MBV_JEG_WNV	DQ080054
MBV_JEG_WNVNY02_Nassau	DQ164195	MBV_JEG_WNVJCA03Arcadia	DQ080058
MBV_JEG_WNVNY02 Queens	DQ164186	MBV_JEG_WNVGA02	DQ164196
MBV_JEG_WNVNY02_Clinton	DQ164193	MBV_JEG_KUNV	D00246
MBV_JEG_WNV	DQ080056	MBV_JEG_WNVFCA03	DQ080055



Qué orgullo es ser marismeño
de esa marisma huelvana,
donde crecen los helechos,
las amapolas y las cañas.
Qué bonito es el Rocío,
qué bonita es la Marisma
y que bonito es Doñana.

