



VIRUS DE LA FIEBRE DEL NILO: INCIDENCIA EN LA PROVINCIA DE SEVILLA



Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

Realizado por Ana Belén Flores Acal



Trabajo de Fin de Grado

Grado de Farmacia

Virus de la fiebre del Nilo: Incidencia en la provincia de Sevilla

(Revisión bibliográfica)

Realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia

Estudiante:

Ana Belén Flores Acal

Tutora:

Dra. Eloísa Pajuelo Domínguez

Lugar y fecha de presentación: Sevilla, 2022

Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

ABREVIATURAS

ADE	Antibody dependent enhancement
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
BHE	Barrera hematoencefálica
BSL-3	Biosafety level 3
CDC	Center for Disease Control
ELISA	Enzyme linked inmunosorbent assay
HEPA	High Efficiency Particle Arresting
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón
IL-6	Interleuquina-6
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MTasa	Metiltransferasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Open Reading Frame
PFA	Parálisis flácida aguda
PRNT	Prueba de neutralización por reducción de placas
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SNC	Sistema nervioso central
ss[ARN(+)]	ARN monocatenario de polaridad positiva
TLR-3	Receptor Toll-like
TNF	Factor de necrosis tumoral
VNO	Virus del Nilo Occidental

ÍNDICE

Resumen

1. Introducción.....	6
2. Objetivos.....	11
3. Metodología.....	11
4. Resultados y discusión.....	12
4.1. Genoma del virus.....	12
4.2. Proteínas estructurales.....	13
4.3. Proteínas no estructurales.....	13
4.4. Sintomatología.....	15
4.5. Patogenia de la infección.....	15
4.6. Vías de transmisión.....	18
4.7. Epidemiología.....	19
5. Diagnóstico.....	24
6. Estrategias para el control del virus del Nilo Occidental.....	25
7. Conclusiones.....	28
8. Bibliografía.....	29

RESUMEN

El virus del Nilo Occidental (VNO) se aisló por primera vez en 1937 en el distrito del Nilo Occidental del norte de Uganda. Se trata de un virus neurotrópico que pertenece a la familia *Flaviviridae*, concretamente al género *Flavivirus*. Es un virus envuelto, de ARN monocatenario y polaridad positiva, cuya longitud es de unos 11.000 nucleótidos.

En las últimas dos décadas se ha registrado un aumento continuo de casos en humanos en la Unión Europea y países vecinos. En España la infección por VNO se considera una enfermedad de declaración obligatoria (EDO) urgente.

El VNO es un arbovirus, es decir, se transmite por artrópodos hematófagos. En la mayoría de casos tiene lugar por la picadura del mosquito infectado (vector), siendo los principales vectores hembras de distintas especies del género *Culex*. El cambio climático parece jugar un papel clave en la propagación del virus.

La mayoría de casos cursan de manera asintomática. Sin embargo, un pequeño porcentaje puede desarrollar encefalitis, meningitis o parálisis flácida aguda. Para que la infección llegue al sistema nervioso central debe atravesar la barrera hematoencefálica (neuroinvasión). La tasa de mortalidad tras la neuroinvasión es aproximadamente del 10%, con mayor riesgo para pacientes inmunodeprimidos, de edad avanzada, hombres así como con afecciones subyacentes.

Actualmente no existe tratamiento específico con antivirales ni vacunas disponibles en humanos. Por tanto, las medidas preventivas se abordan tanto a nivel individual, evitando la exposición a los mosquitos mediante el uso de repelentes, mosquiteras y ropa de mangas largas entre otras, como a nivel comunitario donde juega un papel clave la educación sanitaria y la fumigación.

En este trabajo se revisa además la epidemiología de esta enfermedad en Andalucía, concretamente en las provincias de Sevilla y Cádiz, donde se han dado varios casos en los últimos años, algunos de ellos con consecuencias fatales.

Palabras clave: Virus del Nilo, Fiebre del Nilo, *Flavivirus*, *Culex*, ARN, detección, prevención.

1. INTRODUCCIÓN

El virus del Nilo Occidental (VNO) se aisló por primera vez en 1937 de una mujer que presentaba un cuadro febril en el distrito del Nilo Occidental del norte de Uganda. Se relacionó estos síntomas con un posible caso de fiebre amarilla; sin embargo, al inocular ratones con su suero se obtuvo como resultado el aislamiento de un virus con propiedades similares a las de dos flavivirus (el virus de la encefalitis de Saint Louis y el virus de la encefalitis B japonesa) con los que compartía relaciones inmunológicas. Aunque solo presentaba fiebre, los primeros estudios del virus que se acababa de descubrir determinaron que la patología involucraba principalmente al sistema nervioso central (SNC), sugiriendo su naturaleza neurotrópica (Sejvar, 2003).

El virus del Nilo Occidental es un virus neurotrópico que pertenece a la familia *Flaviviridae*, concretamente al género *Flavivirus* (Samuel y Diamond, 2006). Se trata de un virus envuelto, de ARN monocatenario y polaridad positiva [ssRNA(+)], cuya longitud es de unos 11.000 nucleótidos. La polaridad positiva indica que la cadena de ARN es codificante, es decir que actúa como ARNm que va directamente a traducirse en los ribosomas dando una poliproteína que posteriormente se escinde. Es esférico y de pequeño tamaño (en torno a 50 nm de diámetro). Presenta una nucleocápside de proteína icosaédrica (C) rodeada por una bicapa lipídica, conocida como envoltura en la que las proteínas de membrana (M) se insertan junto con una serie de glicoproteínas llamadas espículas (Lindenbach et al., 2001). (Figura 1).

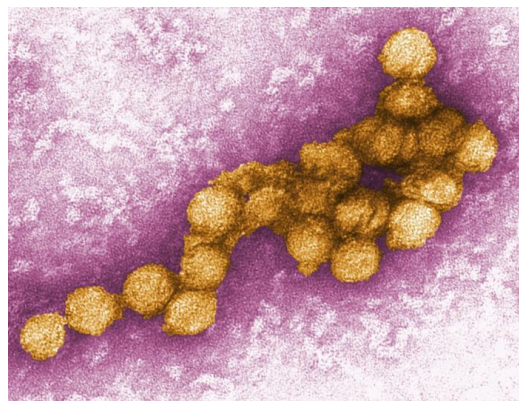


Figura 1. Micrografía electrónica del virus de la fiebre del Nilo (también denominado virus del Nilo Occidental). Tomada de: Public Health Image Library (PHIL), Center for Disease Control, USA (<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=10701>).

En las últimas dos décadas se ha registrado un aumento continuo de casos humanos por el VNO en la Unión Europea (UE) y países vecinos, particularmente en los países del sur como Grecia, Italia, Serbia, y también en Hungría y Austria.

Concretamente en España se localiza un foco de esta enfermedad en las provincias de Sevilla y Cádiz. En los últimos años en la provincia de Sevilla se han observado brotes relacionados con la zona del Guadalquivir (Coria del Río, Villamanrique de la Condesa y La Puebla). Los periódicos se han hecho eco de estos casos, que han aparecido en las portadas de varios noticieros (Figura 2). Aunque la enfermedad como veremos tiene buen pronóstico en la mayoría de los casos, se han producido complicaciones en algunos casos llevando a la muerte del paciente, caso del que también se hicieron eco los rotativos. Así como de las secuelas de la enfermedad en niños (Figura 2.D).

La preocupación de las autoridades sanitarias llevó a tareas de fumigación intensas en los arrozales (Figura 2.C), sitio donde se cría el mosquito que como veremos es la principal vía de transmisión de este patógeno.

VIRUS DEL NILO >

El virus del Nilo se cobra la primera víctima mortal de 2021 en Sevilla

Hay otras dos personas infectadas por meningoencefalitis en la provincia. Los alcaldes de la zona critican la pasividad de la Junta en el control del mosquito



EVA SAIZ
Sevilla - 20 AGO 2021 - 23:26 | Actualizado 23 AGO 2021 - 09:07 CEST



Parque del Ayuntamiento de Coria del Río, en Sevilla. MARÍA JOSÉ LÓPEZ DE HARO / PEPIN

Una mujer de 73 años se ha convertido en la primera víctima mortal del virus del Nilo en Andalucía en 2021. La fallecida, vecina de Coria del Río (Sevilla), según ha comunicado la

A

SEVILLA PROVINCIA ANDALUCÍA ESPAÑA ECONOMÍA SOCIEDAD DEPORTES CULTURA COFRADÍAS OPINIÓN = TODAS LAS SECCIONES
PROVINCIA DOS HERMANAS ALCALA DE GUADAIRA ALJARAFE AGUI LA PROVINCIA

ALJARAFE

El CSIC detecta de nuevo el virus del Nilo en mosquitos del entorno de los arrozales de La Puebla

- La presencia del patógeno ha sido confirmada por el Instituto Carlos III y ya se ha remitido a la Junta un primer informe por escrito
- Los ayuntamientos de Coria y La Puebla siguen pendientes de una reunión con Salud para poner en marcha un plan de choque



Un mosquito fotografiado en los laboratorios de la Estación Biológica de Doñana. / ANTONIO FIGARRO

TRINIDAD PERDIGUERO
03 Agosto 2021 - 07:17h



El equipo de la Estación Biológica de Doñana responsable del Observatorio de Mosquitos del Guadalquivir. En la fotografía las relaciones de los insectos con

B



Sociedad

EDUCACIÓN MEDIO AMBIENTE IGUALDAD SANIDAD CONSUMO LAICISMO CONSUMO

VIRUS DEL NILO

Andalucía fumigará con drones los pantanales del Guadalquivir para atajar el virus de Nilo

La Junta asumirá estos trabajos a través de la licitación de un contrato de emergencia de 100.000 euros



Tarea de fumigación en Almonailla (Sevilla). EUROPA PRESS

La Junta de Andalucía ha decidido asumir la fumigación a través de drones de los pantanales y arrozales del Guadalquivir donde se cría el mosquito que provoca la fiebre del Nilo y evitar su propagación. La financiación correrá enteramente a cargo del Gobierno regional, que sacará a licitación un contrato de emergencia por valor de 100.000 euros para llevar a cabo esta medida. Esta decisión supone un cambio en la estrategia del Ejecutivo que dirige el popular Juan Manuel Moreno, que hasta ahora había mantenido que los

C



Ciencia / Materia

ASTROFÍSICA MEDIO AMBIENTE INVESTIGACIÓN MÉDICA MATEMÁTICAS PALEONTOLOGÍA

VIRUS DEL NILO >

Las severas secuelas que dejó el virus del Nilo en los niños infectados

Un equipo de investigadores estudia cómo afecta el patógeno a los menores tras el brote con ocho muertos en Andalucía hace un año



Óscar Vireo (izq.), jefe de laboratorio submicroscópico del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla y José Miguel Casares, director de la unidad de enfermedades infecciosas de dicho hospital. PACO FUENTES / EL PAÍS

D

Figura 2. **A:** Portada del periódico El País del día 20 de agosto de 2021 en la que se informa sobre la primera víctima mortal en 2021 del VNO en Sevilla. Tomada de: (<https://elpais.com/sociedad/2021-08-20/el-virus-del-nilo-se-cobra-la-primera-victima-mortal-de-2021-en-sevilla.html>). **B:** Portada del periódico Diario de Sevilla del día 3 de agosto de 2021 donde se informa sobre la detección de VNO en mosquitos en los arrozales de la Puebla por parte del CSIC. Tomada de: (<https://www.diariodesevilla.es/aljarafe/mosquitos-virus-Nilo->

detectado-arrozales-informe-CSIC-Puebla-Rio-Coria_0_1597940643.html) C: Portada del periódico El País del día 1 de septiembre de 2020 donde se informa sobre la fumigación de los pantanales del Guadalquivir. Tomada de: (<https://elpais.com/sociedad/2020-09-01/andalucia-fumigara-con-drones-los-pantanales-del-guadalquivir-para-atajar-el-virus-de-nilo.html>) D: Portada del periódico El País del día 10 de diciembre de 2021 donde se informa sobre las secuelas en niños infectados por el virus del Nilo. Tomada de: (<https://elpais.com/ciencia/2021-12-10/las-severas-secuelas-que-dejo-el-virus-del-nilo.html>)

Más recientemente, y en el contexto de la pandemia causada por el SARS-Cov-2, ha surgido una nueva preocupación y es la presencia de ambos patógenos simultáneamente en algunas personas, con el agravamiento de los síntomas. (Figura 3).



Figura 3. Portada del periódico El País del día 10 de junio de 2021 donde se comunica la detección del primer caso de Covid y VNO en Sevilla. Tomada de: (<https://elpais.com/ciencia/2021-06-16/detectado-en-sevilla-el-primer-caso-de-un-paciente-infectado-con-covid-y-virus-del-nilo-occidental.html>).

Además de su impacto mediático, la importancia de esto se ha visto reflejada tanto en la incidencia como en el aumento del número de publicaciones (Figura 4). Esta figura está elaborada por la autora del Trabajo de Fin de Grado tras consultar las bases de datos, en particular PubMed en los últimos 20 años. Utilizando las palabras clave: West Nile Virus, Flavivirus, West Nile Virus Vaccine y West Nile Virus treatment, hemos anotado el número total de publicaciones desde 1950. Como puede observarse, hay un incremento enorme de la investigación científica en este tema en las dos últimas décadas.

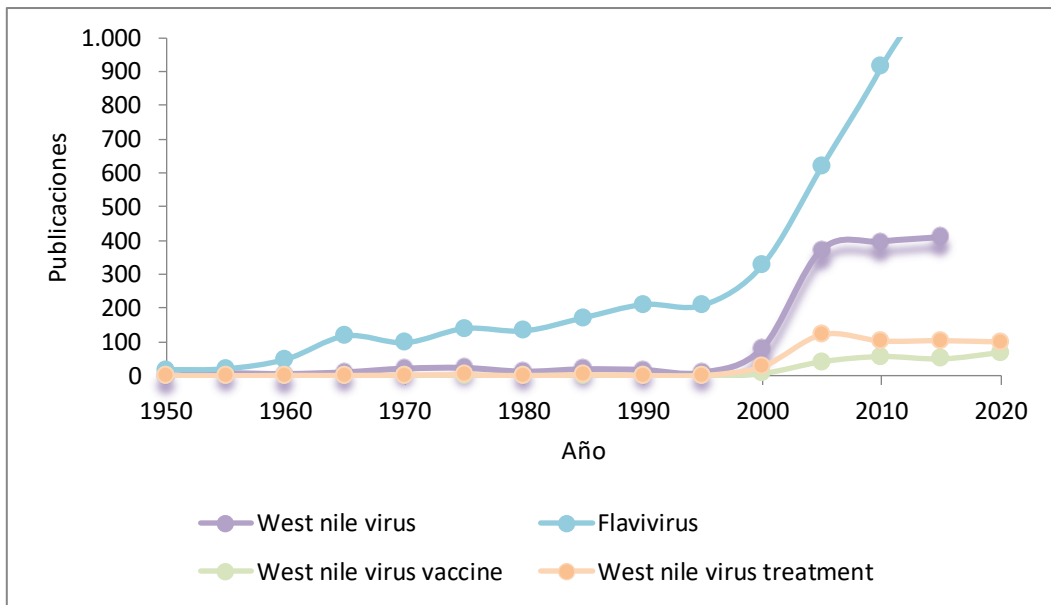


Figura 4. Gráfico del número de publicaciones que contiene las palabras clave relacionadas con el virus del Nilo. Elaboración propia.

Estos resultados indican por una parte la actualidad del tema, la importancia social y médica del mismo, su impacto en las comunidades que viven cerca de los arrozales o zonas encharcadas y por otra parte su relevancia científica, motivos por los que se ha elegido este tema para el Trabajo de Fin de Grado.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo consiste en la realización de una revisión bibliográfica sobre el virus del Nilo Occidental prestando especial atención a la incidencia del mismo en la provincia de Sevilla. Se plantearán los siguientes objetivos:

- Descripción morfológica del virus. Genómica estructural y funcional, vías de transmisión y reservorio.
- Descripción de la patología y mecanismo de infección.
- Situación epidemiológica a nivel mundial, europea, nacional y en particular en Sevilla.
- Revisión del abordaje y tratamiento actual.
- Revisión de las medidas profilácticas y estrategias para el control del VNO.

3. METODOLOGÍA

Para la realización de esta revisión bibliográfica se han utilizado las siguientes bases de datos: PubMed, Scopus y Google Académico. También se han consultado fuentes como la Organización Mundial de la Salud (OMS), Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad del Gobierno de España, Center for Disease Control (CDC) e Instituto Carlos III.

La metodología de búsqueda se llevó a cabo empleando las palabras clave "Nile fever virus", "West Nile virus", "*Flavivirus*", "West Nile Virus Vaccine", "West Nile Virus treatment"

De entre todos los artículos obtenidos se han priorizado preferentemente que se trate de artículos en inglés y de revistas de elevado impacto internacional, si bien también se han utilizado algunas revisiones en español; y preferentemente de los últimos 10 años, se han incluido algunos artículos de anterior fecha de publicación por su especial relevancia histórica. La gestión de los artículos seleccionados se ha llevado a cabo utilizando la base de datos Mendeley.

4. RESULTADOS

4.1 GENOMA DEL VIRUS

El genoma viral contiene un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica una poliproteína cuya escisión es facilitada tanto por la célula huésped como por las proteasas virales dando lugar a proteínas estructurales y no estructurales (Dubrau et al., 2017). Todas ellas van a ejercer un papel específico en la patogénesis de la infección. De esas proteínas, siete son no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) e intervienen en la transcripción, replicación y supervivencia del virus atenuando las respuestas antivirales del huésped. Y tres son estructurales, es decir forman parte de la partícula del virión: proteínas de la cápside (C), premembrana/membrana (prM/M) y envoltura (E) (Samuel y Diamond, 2006). (Figura 2). Filogenéticamente, se han descrito hasta 7 linajes, siendo el linaje 1 y 2 aquellos capaces de causar enfermedad humana o animal (Mackenzie y Williams, 2009). Y aunque ambos son similares en cuanto a patogenicidad, actualmente, el linaje 2 es el responsable de la mayoría de los casos que se dan en Europa (CCAES, 2021).

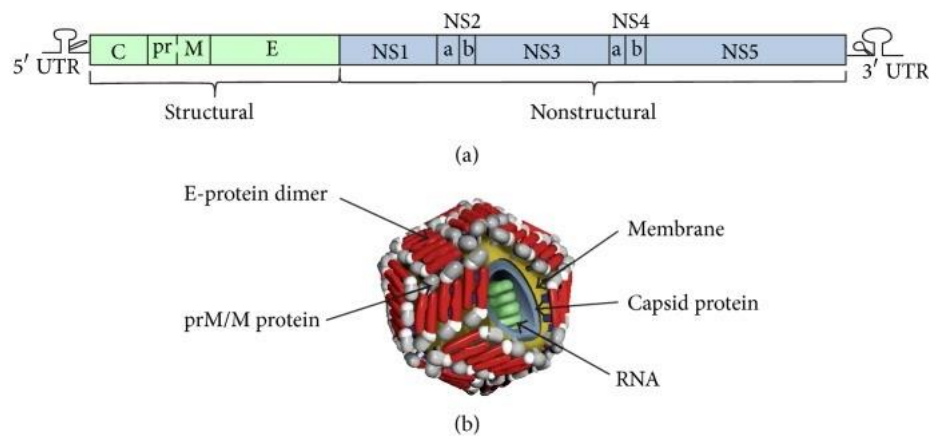


Figura 5. Estructura del genoma del virus del Nilo Occidental y de la posición de las proteínas estructurales en la partícula viral. Tomada de: The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. BioMed Research International.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383390/>

4.2 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

La proteína de la cápside (C) ejerce un papel fundamental en el ensamblaje y la replicación viral (Zhang et al., 2007). Durante la replicación viral, la encapsidación y la liberación o desrecubrimiento del ARN se ve reforzado por la unión de la proteína C al ARN genómico viral. Entendiéndose el desrecubrimiento como el proceso por el cual, el genoma viral que se encuentra formando una estructura compacta con las proteínas se libera o desempaqueta para poder replicarse en otra célula huésped. Tras la internalización viral, la proteína C se degrada por la vía del proteosoma (Wang et., al 2016). Produce efectos citotóxicos en células infectadas deteniendo el ciclo celular, induciendo la apoptosis y produciendo finalmente la muerte celular. Se trata de una proteína funcionalmente flexible, lo que permite al virus sobrevivir y adaptarse a diversas mutaciones (Oh et al., 2006).

La proteína E mantiene la integridad de la envoltura (Heinz y Stiasny, 2012) y juega un papel muy importante pues es el principal determinante antigénico del virus, es la proteína más inmunogénica (Londono y Colpitts, 2016). Se trata de una glicoproteína compuesta por 3 dominios, siendo el dominio III el objetivo de los anticuerpos neutralizantes del hospedador, ya que contiene numerosos epítomos que van a ser reconocidos por estos. Esto lo convierte en la principal diana para el desarrollo de vacunas y fármacos (Bonafe et al., 2009).

La proteína de membrana (M) es el resultado de la escisión de prM/M, una glicoproteína asociada a la bicapa lipídica. Esta escisión es llevada a cabo por una furina y es esencial para la maduración del virus (Slon et al., 2018). A pH neutro, la proteína prM se encuentra unida a la envoltura en el virus inmaduro, el cual no es infeccioso (Yan et al., 2015). Sin embargo, a un pH aproximadamente de 6 estas partículas inmaduras sufren un cambio conformacional produciéndose la maduración del mismo y dando lugar a una partícula infecciosa (Gillespie et al., 2010). Es decir, tiene una función protectora respecto a las proteínas de la envoltura, evitando la fusión temprana con las membranas del huésped (Londono y Colpitts, 2016).

4.3 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

La proteína NS1 es esencial para la replicación debido a su capacidad para evadir el sistema inmune del huésped (Chung et., al 2006). En la célula infectada, NS1 se encuentra extracelularmente (asociado a la membrana celular) e intracelularmente y su función va a variar según la localización. La forma extracelular participa en la regulación y evasión del

sistema inmune innato a través de la modulación del complemento, mientras que la forma intracelular está involucrada en la replicación y maduración del virus. Además de mejorar la estabilidad del virus en la célula huésped (Gutsche et al., 2011). Durante la infección NS1 se secreta activamente convirtiéndose en un marcador serológico útil. Se ha demostrado que NS1 juega un papel clave en la neuroinvasividad del VNO (Melian et al., 2010).

La proteína NS2A está involucrada en la replicación del ARN viral, la formación de estructuras membranosas y el ensamblaje del virión. También participa en la regulación de las respuestas inmunitarias del huésped y la diseminación viral ya que interrumpe la respuesta del interferón (IFN) del huésped (Leung et al., 2008).

La proteína NS2B actúa como cofactor imprescindible para la actividad de NS3 (Chappell et al., 2008). NS3 es una proteína multifuncional imprescindible para la replicación y el ensamblaje del virión que solo es activa en presencia de su cofactor (NS2B). Su actividad principal es la escisión de la poliproteína recién traducida en las uniones NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 (Brinton, 2002). Hay estudios que la sugieren como una posible diana para el desarrollo de fármacos (Chappell et al., 2008).

La proteína NS4 puede actuar como cofactor regulando la actividad ATPasa de la helicasa NS3 y puede estar relacionada con la evasión inmune (Shiryaev et al., 2009). Su interacción con NS1 es imprescindible para la síntesis del ARN viral (Brinton et al., 2002). Participa en el proceso de replicación del virus a través de la reorganización de la membrana viral (Li et al., 2017).

La proteína NS4B juega un papel clave en la inhibición de la señalización del interferón del virus por tanto es crucial para la evasión inmune (Wicker et al., 2012).

La proteína más grande es NS5. Tiene dos actividades enzimáticas diferentes: el extremo N-terminal tiene actividad metiltransferasa (MTasa), mientras que el C-terminal codifica la ARN polimerasa viral dependiente del ARN responsable de la replicación del genoma del virus (Davidson et al., 2009). La metilación correcta de la caperuza en las posiciones guanina N7 y ribosa 2'OH de la primera adenina transcrita es necesaria para la infectividad óptima del virus. Aquellos que son deficientes en el mecanismo de metilación N7 no son replicativos, mientras que los viriones que carecen de la metilación 2'OH son replicativos pero atenuados (Dong et al., 2009). Ambas actividades convierten a NS5 en un objetivo antiviral prometedor porque su actividad es necesaria para proteger el extremo 5' del ARN viral implicado en replicación viral (Londono y Colpitts, 2016).

4.4 SINTOMATOLOGÍA

En los seres humanos, la infección por el VNO es asintomática en aproximadamente un 80% de los casos; sin embargo, en el 15-20% se produce la fiebre del Nilo Occidental (enfermedad leve similar a la gripe). El periodo de incubación se sitúa entre 2-14 días. Los síntomas son de inicio brusco y pueden incluir malestar general, dolor ocular, dolor de cabeza, mialgia, náuseas, vómitos y erupción cutánea. Un pequeño porcentaje (1 de cada 150) puede desarrollar encefalitis, meningitis o parálisis flácida aguda (PFA) cuyos síntomas son principalmente dolores de cabeza, fiebre elevada, rigidez de nuca, estupor, desorientación, coma, temblores, convulsiones, debilidad muscular y parálisis. Las secuelas neurológicas a largo plazo son comunes en más del 50% de estos casos (Lim et al., 2011). La tasa de mortalidad tras la neuroinvasión es aproximadamente del 10%, con mayor riesgo para los pacientes inmunodeprimidos, de edad avanzada, en hombres, consumo excesivo de alcohol o con afecciones subyacentes como la diabetes, enfermedad renal crónica, enfermedad cardiovascular, hipertensión o cáncer (Murray et al., 2006).

4.5 PATOGENIA DE LA INFECCIÓN

La entrada del virus en la célula se produce por endocitosis mediada por receptores y fusión de la membrana viral con el endosoma tras la unión del virus a la superficie celular. De esta manera, la nucleocápside es liberada en el citoplasma y el ARN viral se asocia a la membrana del retículo endoplásmico. El marco de lectura abierto se traduce en la poliproteína que se digiere enzimáticamente dando lugar a las 10 proteínas nombradas anteriormente, (las 3 estructurales: cápside, premembrana (prM) / membrana (M) y envoltura (E) y las 7 no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Cho y Diamond, 2012).

Al ser un virus de ARN monocatenario y polaridad positiva cuando el virus se descapsida y se libera el material genético, ese ARN actúa como ARNm y se traduce directamente en proteínas. Una de las proteínas que sintetiza el virus es la ARN polimerasa dependiente de ARN, que va a sintetizar una cadena sencilla de ARN complementaria, es decir una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad negativa que va a servir de molde para que esta misma enzima sintetice la complementaria. De esta forma se obtiene ARN de cadena sencilla y proteínas que se ensamblan dando lugar al virión ssARN+. Estos viriones son inmaduros y tras la escisión de la proteína prM a la proteína M en el aparato de Golgi se produce una

reorganización de las proteínas E en la superficie del virus generando los viriones maduros que van a ser secretados al espacio extracelular por exocitosis (Mukhopadhyay et al., 2003).

Se han realizado múltiples estudios en ratones para conocer la patogénesis, la cual puede describirse en 3 etapas: una fase temprana en la que se da la infección inicial y la propagación, a esta fase le sigue una fase virémica que consiste en la amplificación periférica del virus y finalmente la neuroinvasión (entrada al SNC). Se piensa que este modelo es extrapolable al mecanismo de infección en humanos (Suthar y Pulendran, 2014).

Tras la picadura del mosquito la infección comienza en los queratinocitos, células de Langerhans y células dendríticas de la piel que son las células diana donde se replica, aumentando la carga viral y a través de distintos mecanismos, entre los que se incluye la supresión del transporte de células inmunoefectoras al sitio de inoculación estas células infectadas migran a los ganglios linfáticos y al bazo generando una viremia primaria que posteriormente se extiende a órganos viscerales (como el hígado y el riñón, entre otros) y finalmente al sistema nervioso central (SNC) (Petersen et al., 2013). (Figura 6).

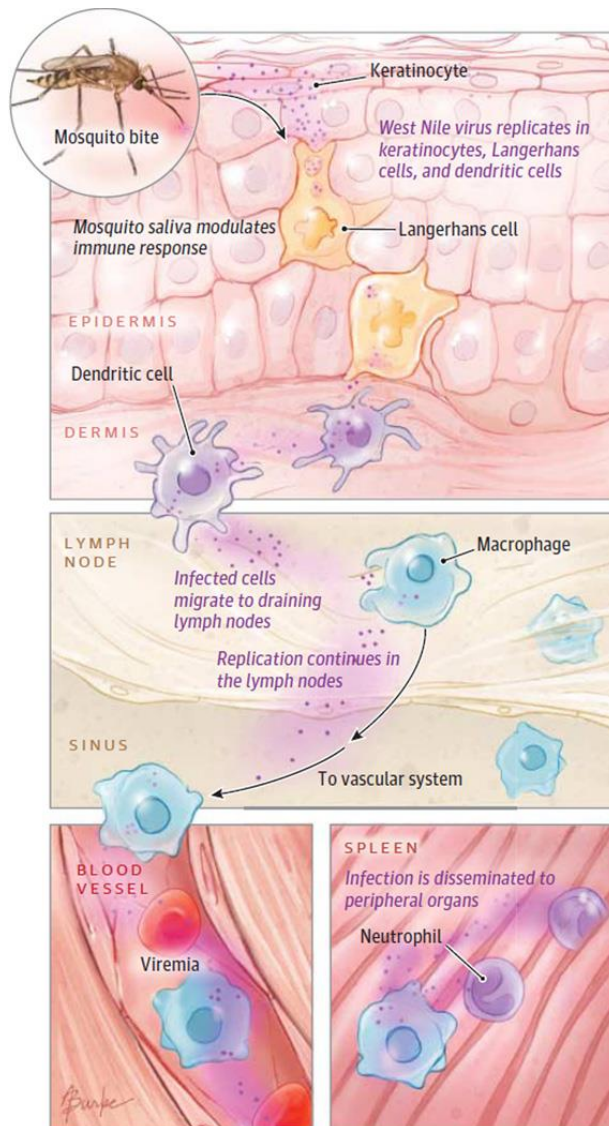


Figura 6. Esquema de la patogénesis del virus del Nilo Occidental. Tomada de: West Nile Virus: Review of the Literature <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4563989/>

Se trata de un virus neurotrópico, pero para que la infección llegue al SNC primero debe atravesar la barrera hematoencefálica (neuroinvasión). El virus del Nilo puede llegar al sistema nervioso central a través de distintos mecanismos, entre los que se incluye el transporte retrógrado axonal a lo largo de las neuronas periféricas infectadas hacia la médula espinal o probablemente se deba al transporte hematógeno a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Las posibles rutas de entrada del virus a través de la BHE incluyen:

El modelo de "caballo de Troya" que consiste en el transporte intracelular dentro de macrófagos o neutrófilos, es decir, el virus se encuentra en su interior y atraviesa así la barrera

hematoencefálica. Otro mecanismo propuesto es la alteración de la permeabilidad de la BHE debido a que la infección de los tejidos periféricos induce la secreción mediada por el receptor Toll-like (TLR)-3 de citoquinas proinflamatorias (especialmente IL-6, TNF- α) alterando las uniones estrechas que la conforman permitiendo el acceso a la BHE y provocando la infección de las neuronas. Otros posibles mecanismos serían la infección directa de células endoteliales microvasculares cerebrales, por otro lado estaría la infección de las células epiteliales del plexo coroideo; o la infección directa de neuronas olfativas y propagación al bulbo olfatorio (Cho y Diamond, 2012).

Estos resultados se han obtenido de estudios en modelos animales, el mecanismo preciso de entrada en el SNC en humanos requiere más estudio, y puede haber diferencias en función de la ruta de infección y la patogenicidad de la cepa. Sin embargo, en los humanos el virus se ha detectado mayormente en neuronas de la corteza cerebral, el tálamo, el tronco encefálico, los ganglios basales, el cerebelo y la médula espinal (en algunos casos también en el bulbo olfatorio e hipocampo) al igual que en los ratones infectados. Esto indica que los resultados podrían ser extrapolables. Además debido a la aparición en distintas zonas del cerebro y médula espinal se concluye que la propagación hematogena es una forma evidente de entrada al SNC. El análisis en muestras humanas proporcionó evidencia de gliosis, esto quiere decir que durante la infección también están implicadas células microgliales y astrocitos. En cambio, los estudios realizados en ratones solo muestran evidencia de la infección en neuronas, mientras que en células gliales la evidencia es limitada (Samuel y Diamond, 2006).

4.6 VÍAS DE TRANSMISIÓN

El virus del Nilo Occidental es un *arbovirus*, es decir se transmite por artrópodos hematófagos. En la mayoría de los casos tiene lugar por la picadura del mosquito infectado (vector). Los principales vectores son hembras de distintas especies del género *Culex* (*C. tarsalis*, *C. quinquefasciatus*, *C. stigmatosoma*, *C. thriambus*, *C. pipiens* y *C. nigripalpus* y hasta más de 65 especies), siendo *Culex pipiens* el predominante en Europa. También se ha encontrado en especies del género *Aedes* (Petersen et al., 2013). Pero la transmisión también se puede dar a través de transfusión de sangre, trasplante de órganos, lactancia e incluso se han documentado casos de infección adquirida en laboratorios (Hayes et al., 2005).

Las aves constituyen el hospedador principal del virus y por tanto el principal reservorio. Sin embargo, los humanos pueden actuar como hospedadores accidentales. (Figura 7). Centrándonos en el principal mecanismo de transmisión, la infección en humanos tiene lugar cuando el mosquito infectado se alimenta de la sangre del huésped y a través de la picadura deposita altas dosis de virus (acumulados en las glándulas salivales del mismo) sobre la dermis. Aunque también hay estudios que indican que algunos mosquitos inoculan una pequeña cantidad de virus en la sangre (Styer et al., 2007).

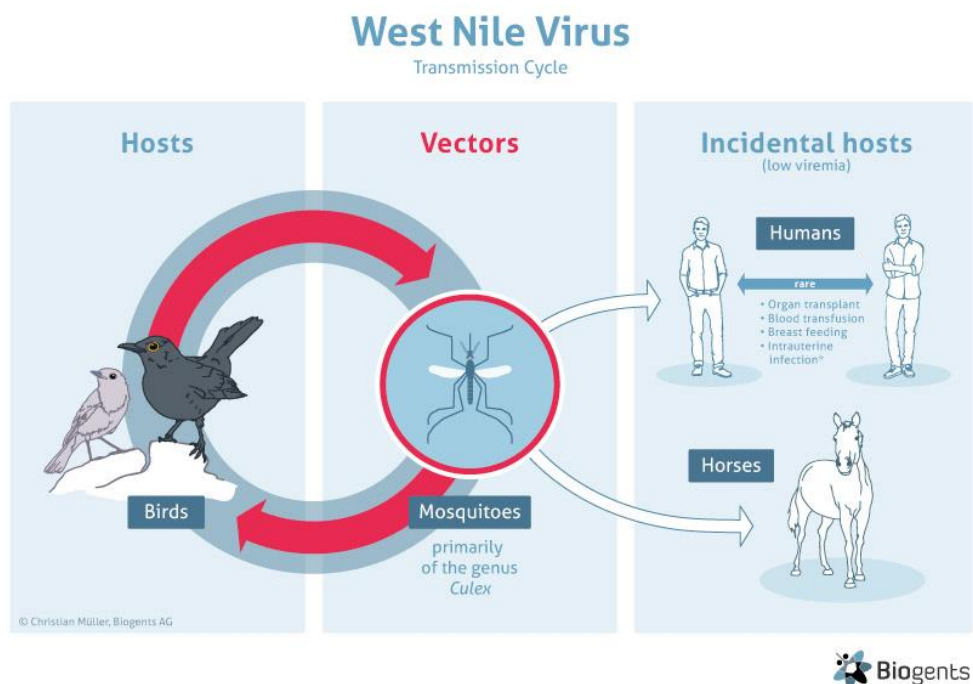


Figura 7. Ciclo de transmisión del VNO. Tomada de: <https://eu.biogen.com/>

4.7 EPIDEMIOLOGÍA

En las últimas dos décadas se ha registrado un aumento continuo de casos humanos por el VNO en la Unión Europea y países vecinos, con brotes importantes en Grecia, Serbia, Italia, Hungría y Austria. La mayoría de las infecciones tiene lugar en verano o principios de otoño, pues como hemos mencionado anteriormente la principal vía de transmisión es a través de la picadura de mosquitos infectados, hecho a tener en cuenta en la prevención y estrategias de control como veremos posteriormente. Entre julio y noviembre de 2010 se produjo una importante expansión de la infección con un total de 342 casos, 40 de ellos fallecidos. En 2018 se registró un aumento extraordinario con un total de 2.083 infecciones, cifra muy superior a

los 1.832 casos notificados en los siete años anteriores. En 2020 y hasta febrero de 2021 se han notificado 336 casos con 38 muertes que tuvieron lugar en Grecia (23), España (8), Italia (5), Rumanía (1) y Bulgaria (1). De manera que en la última década los países más afectados en orden decreciente son Grecia, Italia y Rumanía en la UE, y Rusia, Serbia e Israel, en los países vecinos (ECDC, 2019). (Figura 7).

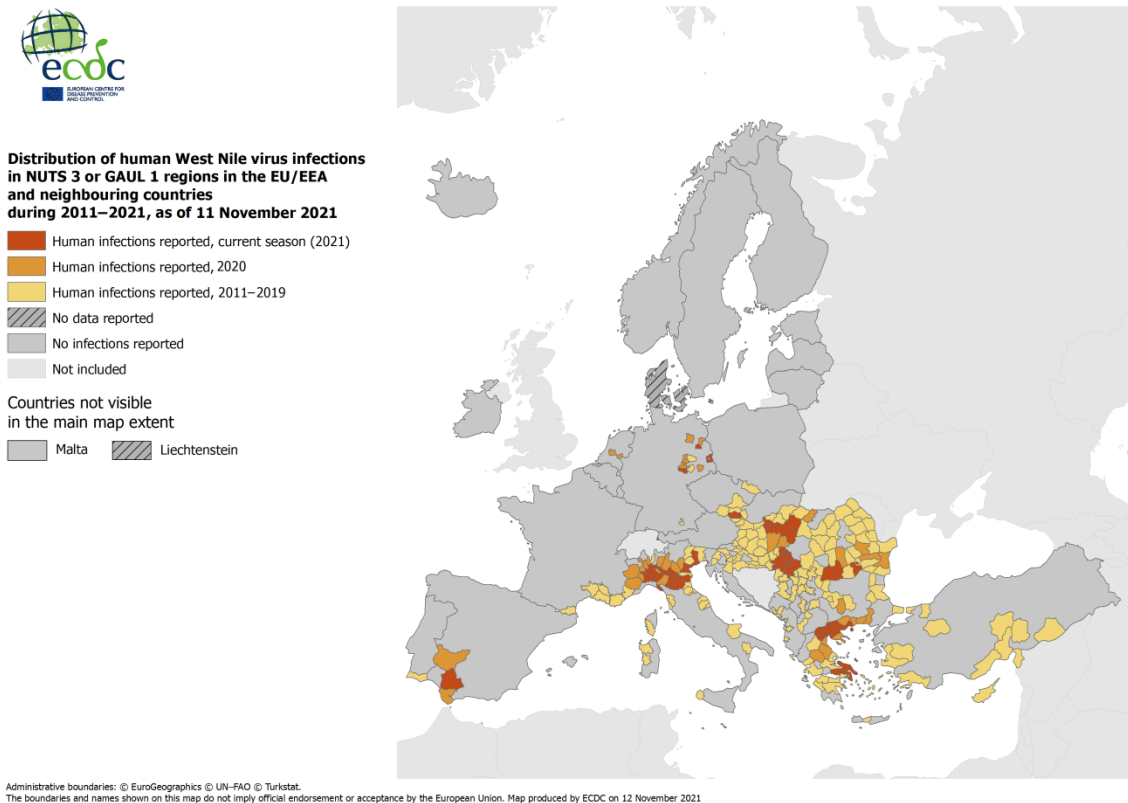


Figura 8. Mapa epidemiológico sobre infecciones humanas del virus del Nilo occidental en Europa y países vecinos durante 2011-2021. Tomada de:

<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2021-human-cases-compared-previous-seasons-updated-11>

El VNO está presente en todos los continentes excepto la Antártida. (Figura 8). Una reciente revisión sobre el VNO en África noroccidental determinó que la enfermedad es endémica en Marruecos, Túnez y Argelia. En América la incidencia en la última década ha sido muy variable de un año a otro por lo que no se observa una tendencia clara, en 2012 se registró un aumento notable de los casos, con un total de 5387 casos (243 muertes), que fue disminuyendo en los años siguientes. La enfermedad se está produciendo en 48 estados contiguos, la incidencia anual media más alta recae sobre el suroeste del país, el delta del Misisipi, las grandes llanuras y la región de las montañas Rocosas (CCAES, 2017).

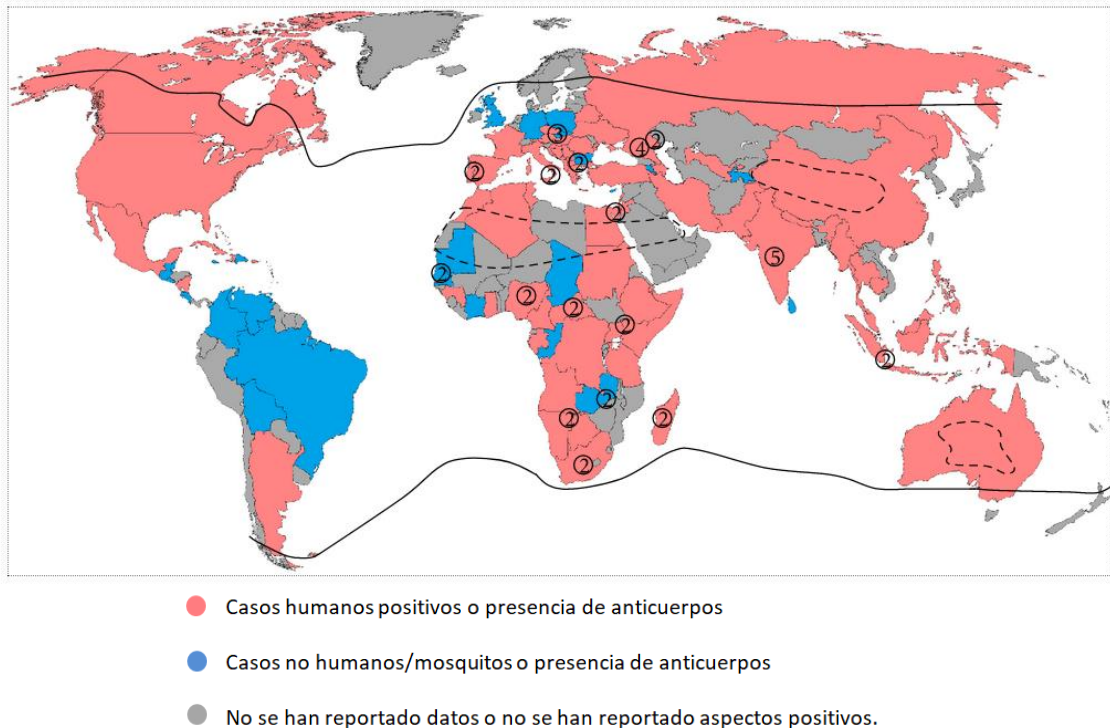


Figura 9. Distribución del VNO por países. Las líneas negras representan la distribución mundial de los principales vectores del VNO, excluyendo áreas de clima extremo denotadas por líneas discontinuas. Los números con círculos indican la presencia reportada de linajes distintos al linaje 1 en esa área específica. Tomada de: The global ecology and epidemiology of West Nile virus. BioMed Research International, 2015.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383390/>

En España se han notificado casos de infección por VNO desde hace dos décadas. Hasta 2019 solo se registraron 6 casos humanos. Sin embargo, en 2020 se registró un brote con un total de 77 casos humanos (56 en la provincia de Sevilla, 15 en Cádiz y 6 en Badajoz). De ellos, el 97% manifestó meningoencefalitis y finalmente 8 fallecieron. En agosto de 2021 se dieron los tres primeros casos de la temporada en Sevilla, dos de ellos en Coria del Río y uno en Villamanrique de la Condesa. Además, se detectaron cuatro focos equinos en municipios cercanos y la presencia de mosquitos infectados en las marismas del Guadalquivir (CCAES, 2021). (Figura 9).

En 2010, el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino alertó sobre la aparición de un brote en équidos en Andalucía, concretamente en Sevilla, Cádiz y Málaga, brote al que se asociaron dos casos humanos detectados posteriormente (Cano et al., 2015).

En España la infección por VNO se considera una enfermedad de declaración obligatoria (EDO) urgente. Se trata de una enfermedad emergente por lo que la detección de un caso sería considerada como un brote. Según la OMS se trata de una enfermedad reemergente en Europa desde 1996 mientras que en EEUU y otros países americanos es emergente desde 1999, lo que supone que al detectar un caso (o brote) cada comunidad autónoma debe notificarlo al Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Servicios Sociales e Igualdad que junto con la comunidad autónoma evaluará las medidas que han de tomarse. También debe notificarse al Centro Nacional de Epidemiología (Cano et al., 2015).

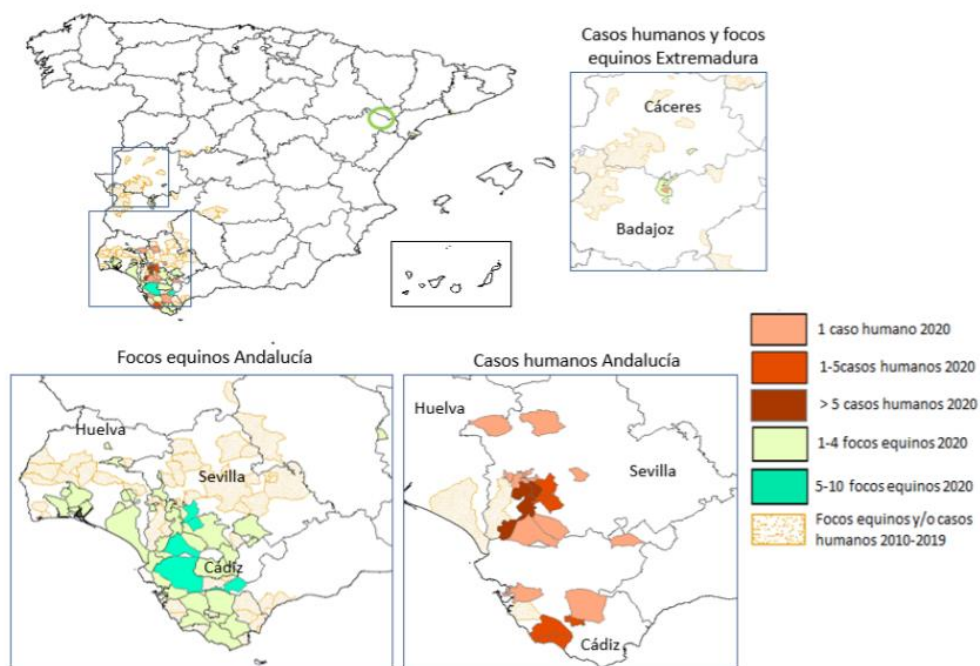


Figura 10. Mapa sobre focos equinos y casos humanos detectados en España en 2010-2020.

Tomada de: *Meningoencefalitis por el virus del Nilo occidental en España*. Ministerio de Sanidad, Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2021.

https://www.sanidad.gob.es/fr/////profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/docs/2020_0925_ERR_Nilo_Occidental.pdf

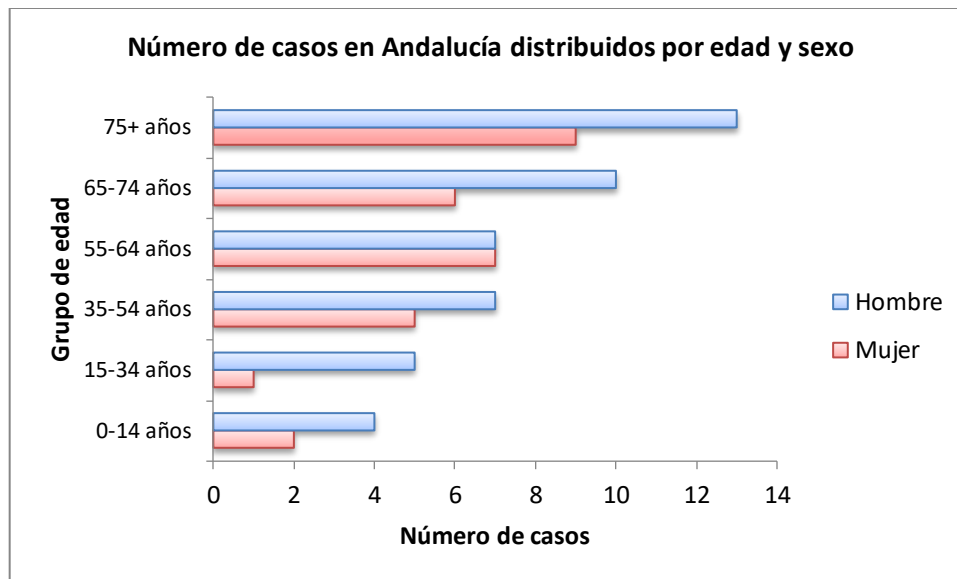


Figura 11. Distribución según sexo y edad de los casos de VNO en Andalucía en 2020.

Elaboración propia. Datos obtenidos en:

https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/OTROS%20INFORMES/Fiebre%20Nilo%20occidental%20resultados_RENAVE%202020.pdf

Como podemos observar en la figura 10, esta enfermedad tiene mayor prevalencia en hombres. De los 77 casos detectados en Andalucía en 2020, 46 son hombres, siendo el grupo más afectado el de hombres mayores de 75 años que va disminuyendo progresivamente a medida que disminuye el rango de edad. En todos los grupos (excepto en el de 55-64 años) se observa una mayor incidencia en hombres. También se dieron 6 casos en niños menores de 14 años afectando de nuevo más al sexo masculino de lo que se concluye experimentalmente que el sexo es un factor de riesgo, así como la edad. Aproximadamente un 95% precisó de hospitalización (RENAVE, 2020).

El cambio climático parece jugar un papel clave en la propagación del virus. Los inviernos suaves y los veranos más calurosos favorecen la propagación de los mosquitos de manera que las enfermedades asociadas a estos han experimentado un notable crecimiento en regiones donde estaban ausentes o eran escasas (Paz, 2015).

5. DIAGNÓSTICO

Las pruebas serológicas constituyen las principales herramientas de diagnóstico en la infección por el VNO. Generalmente se hace a través del análisis de suero o líquido cefalorraquídeo (LCR) para detectar anticuerpos IgM específicos para el VNO. El método más utilizado es el ensayo inmunoenzimático ELISA cuya sensibilidad es del 95-100% tanto en suero como en LCR. Estos anticuerpos suelen detectarse de 3 a 8 días tras el inicio de la enfermedad y pueden persistir de 30 a 90 días (e incluso se ha documentado una persistencia superior, llegando a estar presente durante 16 meses en algunos pacientes con encefalitis). Por tanto, un resultado positivo en IgM podría indicar una infección pasada (Hernández et al., 2009).

La detección de IgM específica para VNO en la sangre o el LCR sería indicativo de una infección reciente, pero también puede deberse a la reacción cruzada de los anticuerpos después de la infección con otros flavivirus. La inmunización reciente con vacunas contra otros flavivirus como la fiebre amarilla o la encefalitis japonesa pueden dar falsos positivos (Kemmerly, 2003).

Para confirmar una posible infección tras las pruebas serológicas se utilizan las pruebas de neutralización por reducción de placas (PRNT) realizadas en laboratorios de referencia, entre los que se incluyen laboratorios de salud pública estatales y los CDC, que ayudan a identificar el flavivirus infeccioso específico. Las PRNT disminuyen el problema de la reactividad cruzada con otros flavivirus que pueden darse en algunos casos analizados mediante ELISA (Hernández et al., 2009).

Además, los cultivos virales y pruebas para detectar el ARN viral como una RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa) se pueden realizar en muestras de suero, LCR y tejido recogidas en el inicio de la enfermedad y, si los resultados son positivos, se confirma la infección. Sin embargo, una RT-PCR negativa no excluye la infección ya que la viremia es baja y de corta duración (Hernández et al., 2009). Por ello, la probabilidad de detectar una infección a través de pruebas moleculares es bastante baja. La inmunohistoquímica puede detectar el antígeno VNO en tejido fijado con formalina (CDC, 2021).

En pacientes fallecidos o con manifestaciones neurológicas el diagnóstico se puede realizar mediante el análisis de una biopsia cerebral intentando aislar el virus por medio de líneas celulares susceptibles como es el caso de células C6/36 procedentes de mosquito y de células

de riñón de mono africano (Vero E6). Tras el aislamiento, la identificación se lleva a cabo por inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando un anticuerpo monoclonal específico marcado con un fluorocromo. De forma paralela, se deben realizar estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos, como PCR, PCR en tiempo real, y RT-nestedPCR, mostrando estas dos últimas mayor sensibilidad que la PCR (Hernández et al., 2009).

6. ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DEL VIRUS DEL NILO OCCIDENTAL

En los últimos años se ha producido un aumento de la incidencia, este aumento en las áreas endémicas ha convertido al VNO en el flavivirus patógeno humano que se transmite por artrópodos con la mayor distribución mundial. El calentamiento global ha favorecido una mayor propagación del virus dando lugar a un aumento de los casos, esto junto con su capacidad para usar distintas especies de mosquitos como vectores así como la susceptibilidad a sufrir mutaciones que conduzcan a una mayor virulencia convierte al VNO en una posible amenaza importante para los seres humanos (Ulbert, 2019).

Dada la importancia de estos acontecimientos, la necesidad de poner en marcha la activación de planes de vigilancia motivó a la red EVITAR (Red de Vigilancia de Enfermedades Víricas Transmitidas por Artrópodos y Roedores) a realizar estudios en 2001 acerca de las actuaciones especialmente en el Parque Nacional de Doñana y el Delta del Ebro. Por otro lado, el Plan de Vigilancia del VNO realizada en aves, équidos y mosquitos se inició en 2007 (RENAVE, 2020).

Y aunque la manera más eficaz de prevención de la enfermedad en humanos sería con el uso de una vacuna, ninguna ha conseguido superar la fase I/II. Solamente está aprobada para équidos a partir de los 5 meses (EMA, 2021).

El desarrollo de una vacuna humana contra el VNO se ha abordado desde múltiples enfoques incluyendo el uso de virus inactivados purificados y atenuados vivos. También se han estudiado vacunas basadas en ácidos nucleicos, partículas similares a virus, elementos de subunidades y virus recombinantes. Sin embargo, ninguna ha sido autorizada en humanos y ninguna de las seis vacunas estudiadas en humanos ha conseguido superar más allá de los ensayos clínicos de fase I/II. De hecho solo dos de ellas: ChimeriVax y rWN/DEN4Δ30 (ambas vacunas quiméricas recombinantes de virus vivos atenuados) que expresan las proteínas prM y E consiguieron aportar una fuerte inmunidad con una dosis (Saiz, 2020).

No obstante, se deben seguir analizando otros aspectos como por ejemplo evitar la posibilidad de que se produzca una potenciación dependiente de anticuerpos (ADE). Esto consiste en la aparición de una reacción heteróloga debido a la unión de anticuerpos que no pueden neutralizar al virus, y que pueden dar lugar a una mayor absorción del virus en las células huésped, lo que se traduce en un aumento de células infectadas como puede ocurrir en las infecciones por otros flavivirus como es el caso del virus del dengue. Y aunque su papel en la patogénesis de las infecciones por flavivirus distintos al dengue sigue siendo objeto de discusión, la ADE provocaría síntomas más severos durante una infección heteróloga secundaria. A pesar de que hay estudios que muestran que DIII no produce ADE para otros flavivirus se debe seguir estudiando para descartar esta posibilidad durante el desarrollo de una vacuna contra el VNO en humanos (Saiz, 2020).

Actualmente no existe tratamiento específico contra la infección por el virus del Nilo. No existen medicamentos antivirales específicos, es decir, el tratamiento se basa en tratar la sintomatología (Cano et al., 2015). Esto junto con la ausencia de vacunas disponibles en humanos hace que las estrategias de prevención actuales se basen principalmente en evitar la picadura de los mosquitos mediante el control de los mismos. Para ello se abordan medidas tanto a nivel individual como a nivel comunitario (CDC, 2020).

A nivel individual se debe evitar la exposición a los mosquitos, evitando estar al aire libre desde el anochecer hasta el amanecer especialmente en verano, protegerse de las picaduras mediante el uso de repelentes, mosquiteras o con el uso de ropa de mangas largas. También es importante la limpieza de criaderos de mosquitos como pueden ser depósitos de aguas estancadas, albercas, o cualquier zona al aire libre que acumule agua (CDC, 2020).

A nivel local se toman medidas como la eliminación de los hábitats así como la aplicación o el rocío de insecticidas para matar tanto las larvas, como los mosquitos adultos. Asimismo en zonas donde se haya detectado la presencia de vectores pueden ser necesarias tareas de fumigación. Otro aspecto importante a nivel comunitario en el que se debe prestar especial atención es la educación sanitaria, realizando campañas de información dirigida a toda la población, especialmente la de riesgo, en la que se informe en qué consiste la enfermedad, así como las medidas de protección. En este último aspecto la oficina de farmacia es un elemento clave ya que es una vía de comunicación con los pacientes en el que se ofrece información sanitaria por parte de personal especializado (CDC, 2020).

También existen programas o aplicaciones que tienen como objetivo la vigilancia y lucha contra la expansión de mosquitos transmisores de enfermedades como por ejemplo

“Mosquito Alert” que permite notificar la localización de algún mosquito de interés (transmisores del dengue, Zika, y en este caso de la fiebre del Nilo) mediante una foto. Posteriormente un equipo especializado estudia y verifica el resultado que se publica en un mapa público. Esta aplicación se centra en la vigilancia de *Aedes albopictus* (mosquito tigre), *Aedes aegypti* (mosquito de la fiebre amarilla), *Aedes japonicus* (mosquito del Japón), *Aedes koreicus* (mosquito de Corea) y *Culex pipiens* (mosquito común) (Mosquito Alert, 2022).

Como hemos mencionado anteriormente también se ha dado esporádicamente alguna infección de manera accidental en trabajadores de laboratorio, por lo que habría que extremar las precauciones y cumplir estrictamente los protocolos establecidos. Al estar clasificado por los CDC como agente de nivel de bioseguridad 3, debe ser manipulado en laboratorios BSL-3. Por tanto, además de las precauciones estándar que han de seguirse en un laboratorio, se deben seguir medidas como: manipulación de las muestras exclusivamente en cabinas de seguridad biológica 2 o 3, uso de batas abrochadas por detrás, laboratorio con doble puerta de acceso, presión negativa en su interior, acceso restringido a personal autorizado, salida del aire a través de filtros HEPA, etc. (Mourya et al., 2014).

Por otro lado, dado que las donaciones sanguíneas también suponen otra vía de transmisión, según el Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, las personas que hayan visitado zonas en las que se de transmisión a humanos de dicho virus quedarán excluidas de donaciones durante al menos 28 días (Cano et al., 2015).

INDIVIDUALES	COLECTIVAS
Uso de repelentes	Fumigación de zonas pantanosas
Uso de mosquiteras	Educación sanitaria
Evitar acercarse a zonas pantanosas especialmente en los meses de primavera y verano	“Mosquito alert”: detección y elaboración de mapas de incidencia del mosquito
Uso de ropa protectora	Desarrollo de vacunas

Tabla 12. Estrategias para el control de la infección por el virus de la fiebre del Nilo a nivel individual y colectivo. Elaboración propia.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo se resumen en los siguientes puntos:

- El virus del Nilo es el agente etiológico de la fiebre del Nilo, cuya importancia social y médica ha experimentado un enorme crecimiento en las últimas dos décadas. En España es considerada una enfermedad de declaración obligatoria (EDO) urgente.
- El aumento en la incidencia de esta patología en la UE y países vecinos ha supuesto un incremento en la investigación de la misma.
- La principal vía de transmisión del virus del Nilo Occidental es a través de vectores, mayoritariamente a través de distintas especies del género *Culex*.
- Actualmente no existe tratamiento específico contra el virus del Nilo, únicamente existen para aliviar o paliar la sintomatología asociada. Las estrategias se centran en evitar la exposición a la picadura de mosquitos a través de programas individuales y comunitarios.
- Continúa en desarrollo la búsqueda de vacunas disponibles para humanos. La proteína E es la principal diana para el desarrollo de vacunas y fármacos.
- El virus del Nilo ha sido el agente causal de numerosos brotes en los últimos años, esto junto con la ausencia de vacunas y tratamientos eficaces lo convierte en una amenaza actual para los seres humanos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Bonafe N, Rininger JA, Chubet RG, Foellmer HG, Fader S, Anderson JF, *et al.* A recombinant West Nile virus envelope protein vaccine candidate produced in *Spodoptera frugiperda* expresSF+ cells. *Vaccine*. 2009; 27(2): 213-222.

Brinton MA. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annual Reviews in Microbiology*. 2002; 56(1): 371-402.

Cano R, Sierra M, Tello O. Informe epidemiológico sobre la situación de la fiebre del Nilo occidental en España. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica [en línea]. 2020. [Consultado en mayo de 2022]. Disponible en: https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/OTROS%20INFORMES/Fiebre%20Nilo%20occidental%20resultados_RENAVE%202020.pdf

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). West Nile virus. Prevention [en línea]. 2021. [Consultado en Mayo 2022] Disponible en: <https://www.cdc.gov/westnile/index.html>

Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES). Informe de situación y evaluación del riesgo de la fiebre por el virus del Nilo Occidental en España. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2017.

Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Evaluación rápida de riesgo. Meningoencefalitis por el virus del Nilo occidental en España. Ministerio de Sanidad, 2021.

Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Research International*. 2015. 2015: 376230.

Chappell KJ, Stoermer MJ, Fairlie DP, Young PR. Mutagenesis of the West Nile virus NS2B cofactor domain reveals two regions essential for protease activity. *Journal of General Virology*. 2008; 89(4): 1010-1014.

Chappell KJ, Stoermer MJ, Fairlie DP, Young PR. West Nile Virus NS2B/NS3 protease as an antiviral target. *Current Medicinal Chemistry*. 2008; 15(27): 2771-2784.

Cho H, Diamond MS. Immune responses to West Nile virus infection in the central nervous system. *Viruses*. 2012; 4(12): 3812-3830.

Davidson AD. New insights into flavivirus nonstructural protein 5. *Advances in Virus Research*. 2009; 74: 41-101.

Dong H, Ren S, Zhang B, Zhou Y, Puig-Basagoiti F, Li H. West Nile virus methyltransferase catalyzes two methylations of the viral RNA cap through a substrate-repositioning mechanism. *Journal of Virology*. 2008; 82(9): 4295-4307.

Dubrau D, Tortorici MA, Rey FA, Tautz N. A positive-strand RNA virus uses alternative protein-protein interactions within a viral protease/cofactor complex to switch between RNA replication and virion morphogenesis. *PLoS Pathogens*. 2017; 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006134>

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Historical Data by Year. West Nile Fever Seasonal Surveillance. 2019.

European Medicines Agency. Science Medicines Health. Proteq West Nile [en línea]. 2021. [Consultado en mayo 2022]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/proteq-west-nile>

Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *Journal of Virology*. 2010; 84(20): 10438-10447.

Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, *et al.* Secreted dengue virus non structural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(19): 8003-8008.

Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; 11(8): 1167-1173.

Heinz F, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of Clinical Virology*. 2012; 55:289–295.

Hernández RI, Bravo LL, Morón DM, Armas E, Girón BJ, Aponte CD. El Virus del Nilo Occidental: Revisión. Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. 2009. 40(1).

Kemmerly SA. Diagnosis and treatment of West Nile infections. *Ochsner Journal*. 2003; 5(3), 16-17.

Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *Journal of Virology*. 2008; 82(10): 4731-4741.

Li Z, Zhang J, Li H. Flavivirus NS2B/NS3 protease: Structure, function, and inhibition. In *Viral proteases and their inhibitors*. Academic Press. 2017; 163-188.

Lim SM, Koraka P, Osterhaus AD, Martina BE. West Nile virus: immunity and pathogenesis. *Viruses*. 2011; 3(6): 811-828.

Lindenbach BD. The viruses and their replication. *Fields Virology*. 2007; 1101-1152.

Londono B, Colpitts, TM. A brief review of West Nile virus biology. En* Tonya M. Colpitts. *West Nile virus Methods and Protocols*. Humana Press; 2016. 1-13.

Luo Y, Guo X, Yan H, Fang D, Zeng G, Zhou J, *et al*. Comprehensive mapping infection-enhancing epitopes of dengue pr protein using polyclonal antibody against prM. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015; 99(14): 5917-5927.

Mackenzie JS, Williams DT. The zoonotic flaviviruses of Southern, South-Eastern and Eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. *Zoonoses and Public Health*. 2009; 56(6-7): 338-356.

Melian EB, Hinzman E, Nagasaki T, Firth AE, Wills NM, Nouwens AS. NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness. *Journal of Virology*. 2010; 84(3): 1641-1647.

Mosquito Alert. [Consultado en mayo de 2022]. Disponible en: <http://www.mosquitoalert.com/proyecto/que-es-mosquito-alert/>

Mourya DT, Yadav PD, Majumdar TD, Chauhan DS, Katoch VM. Establishment of Biosafety Level-3 (BSL-3) laboratory: Important criteria to consider while designing, constructing, commissioning and operating the facility in Indian setting. *The Indian Journal of Medical Research*. 2014; 140(2), 171.

Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ. Structure of west nile virus. *Science*. 2003; 302(5643): 248.

Murray K, Baraniuk S, Resnick M, Arafat R, Kilborn C, Cain K, *et al.* Risk factors for encephalitis and death from West Nile virus infection. *Epidemiology and Infection.* 2006; 134(6): 1325-1332.

Oh W, Yang MR, Lee EW, Park KM, Pyo S, Yang JS, *et al.* Jab1 mediates cytoplasmic localization and degradation of West Nile virus capsid protein. *Journal of Biological Chemistry.* 2006; 281: 30166–30174.

Paz S. Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* 2015; 370(1665), 20130561.

Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. West Nile virus: review of the literature. *Journal of the American Medical Association.* 2013; 310(3): 308-315.

Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolo para la vigilancia de la fiebre del Nilo Occidental de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Madrid, 2020. Disponible en https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/PROTOCOLOS/Protocolo%20vigilancia%20fiebre%20Nilo%20occidental_RENAVE.pdf

Saiz JC. Animal and human vaccines against West Nile Virus. *Pathogens.* 2020; 9(12): 1073.

Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *Journal of Virology.* 2006; 80(19): 9349-9360.

Sejvar JJ. West Nile virus: an historical overview. *Ochsner Journal.* 2003; 5(3): 6-10.

Shiryaev SA, Chernov AV, Aleshin AE, Shiryaeva TN, Strongin AY. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *The Journal of General Virology.* 2009; 90(Pt 9): 2081.

Slon Campos JL, Mongkolsapaya J, Screatton GR. The immune response against flaviviruses. *Nature Immunology.* 2018; 19(11): 1189–1198.

Suthar MS, Pulendran B. Systems analysis of West Nile virus infection. *Current Opinion in Virology.* 2014; 6: 70-75.

Ulbert S. West Nile virus vaccines – current situation and future directions. *Human Vaccines and immunotherapeutics*. 2019; 15(10): 2337-2342.

Wang S, Liu H, Zu X, Liu Y, Chen L, Zhu X, *et al*. The ubiquitin-proteasome system is essential for the productive entry of Japanese encephalitis virus. *Virology*. 2016; 498: 116–127.

Wicker JA, Whiteman MC, Beasley DW, Davis CT, McGee CE, Lee JC, *et al*. Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein. *Virology*. 2012; 426(1): 22-33.

Zhang Y, Kaufmann B, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structure of immature West Nile virus. *Journal of Virology*. 2007; 81(11): 6141-6145.