



Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia

EL VIRUS DEL NILO
OCCIDENTAL: ÚLTIMOS
AVANCES

Marta Roiz Racero



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

EL VIRUS DEL NILO OCCIDENTAL:

ÚLTIMOS AVANCES

AUTOR/A: Marta Roiz Racero

LUGAR Y FECHA DE PRESENTACIÓN: En Sevilla a 21 de julio de 2021

DEPARTAMENTO: Microbiología y Parasitología

TUTOR/A: Cristina Sánchez-Porro Álvarez y Antonio Ventosa Ucero

TIPOLOGÍA DEL PROYECTO: Bibliográfico

RESUMEN

El virus del Nilo Occidental (VNO) es un virus neurotrópico englobado en el género *Flavivirus* dentro del grupo de los arbovirus, de simetría icosaédrica formado por ARN monocatenario de polaridad positiva y 10 proteínas virales imprescindibles, 3 estructurales y 7 no estructurales. El VNO causa la fiebre del Nilo Occidental (FNO) que, en un 1% de los casos, da lugar a encefalitis o meningoencefalitis potencialmente mortal, siendo asintomática en la mayoría de infectados. Hay dos linajes principales: el 1, responsable de síntomas más leves y frecuentes en España; y el 2, asociado a casos más graves. Se transmite a través de la picadura del mosquito *Culex* sp. y también puede afectar a otros animales, principalmente caballos, que actúan como hospedadores accidentales al igual que los seres humanos. El hospedador principal y reservorio son las aves. Se aisló por primera vez en 1937 en Uganda y empezó a propagarse por todo el mundo alcanzando todos los continentes, originando múltiples brotes a lo largo de toda su historia biológica, en la que los factores ambientales y sociales han jugado un papel muy importante. La prevención es hoy en día el único medio que nos asegura la disminución de la prevalencia de la enfermedad, llevándose a cabo actividades de vigilancia a lo largo de toda la etapa activa del vector. Para su diagnóstico se puede recurrir a la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cultivo viral en líquido cefalorraquídeo (LCR) (menos sensible) o serología, evidenciando la seroconversión. El tratamiento es sintomático y de soporte, aunque se han estudiado posibles fármacos específicos para tratar la FNO ninguno ha sido comercializado. Tampoco existen vacunas para humanos, aunque sí para équidos. El último caso que tuvo lugar en España fue en el verano de 2020.

Palabras claves: 'Virus del Nilo Occidental', 'encefalitis', 'arbovirus', 'brotes', 'tratamiento'.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	4
1.1.	¿Qué son los virus?.....	4
1.2.	Arbovirus	6
2.	OBJETIVOS DE LA REVISIÓN	9
3.	METODOLOGÍA.....	9
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1.	Virus del Nilo Occidental	10
4.2.	Historia del virus del Nilo Occidental	10
4.3.	Características del virus del Nilo Occidental	13
4.4.	Ciclo multiplicativo o infeccioso del virus del Nilo Occidental	15
4.5.	¿Cómo se transmite el VNO?.....	21
4.6.	Prevención.....	23
4.7.	Tratamiento.....	26
4.8.	Diagnóstico.....	28
4.9.	Última epidemia en Andalucía.....	31
5.	CONCLUSIONES	33
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ¿Qué son los virus?

La primera vez que se puso de manifiesto la existencia de los virus fue cuando Ivanovsky y Beijerinck comprobaron que el filtrado de una solución libre de bacterias producía una enfermedad desconocida hasta ese momento en las plantas, dándose a conocer así lo que llamaron el virus del mosaico del tabaco, comenzando así una nueva era científica microbiológica (Mustapha, 2020).

Tras estos acontecimientos se llegó a la definición de virus, considerándose patógenos intracelulares obligados, los cuales para replicarse necesitan la maquinaria de la célula huésped en cada fase de su ciclo de supervivencia, produciendo una alteración en las funciones celulares. Además, son considerados los agentes infecciosos más pequeños que existen situándose en el rango de nanómetros (Martín-Acebes et al., 2016; Vargas, 2016; Zhang et al., 2019).

No obstante, por una gran parte de biólogos, los virus son considerados entidades sin vida, cuya función únicamente es la de un artefacto mecánico con capacidad de intercambiar genes de un organismo a otro (Mustapha, 2020).

Los virus se diferencian de las células vivas en al menos tres aspectos (Vargas, 2016):

- Constan de una organización simple y acelular.
- En general, poseen ADN o ARN como material genético, pero no ambos.
- Son parásitos intracelulares obligados.

Aun así, no cabe duda de que son responsables de graves enfermedades, comprometiendo en muchas ocasiones la vida de las personas o animales, por lo que no se les debe subestimar (Mustapha, 2020).

De esta forma existen virus de animales, plantas y bacterias. Aquellos que infectan a las plantas son los conocidos como virus fitopatógenos que a diferencia de los demás no son capaces de penetrar en las células vegetales por sí solos, si no que necesitan que, mediante distintos mecanismos de la naturaleza, sean depositados en el interior de la célula (Linheiro y Fernández, 2016).

Los virus pueden estar conformados por dos tipos de material genético, ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), monocatenario o bicatenario, que se encuentra ubicado en una estructura denominada cápside conformada por unidades proteicas

llamadas capsómeros, a su vez el material genético y la cápside (con dos posibles estructuras, icosaédrica y helicoidal) forman la nucleocápside que en algunos casos está envuelta de una membrana lipídica que proviene del retículo endoplásmico de la célula hospedadora (Hammami, 2020; Vargas, 2016).

Tal y como se ha comentado anteriormente los virus no tienen capacidad de replicarse por sí mismos y necesitan de la maquinaria celular para hacerlo. En función de cómo haga uso el virus de estos componentes podemos diferenciarlos entre virus que desarrollan el ciclo multiplicativo o productivo y virus lisogénicos (Linëiro y Fernández, 2016).

Los virus que llevan a cabo el ciclo multiplicativo son virus cuyo ciclo consiste en la adhesión, penetración del material genético en el interior celular, multiplicación y ensamblaje de las distintas estructuras preformadas para dar lugar a los viriones, que podrán salir de la célula mediante lisis y muerte celular, por gemación o a través de la adquisición de una envoltura membranosa (Linëiro y Fernández, 2016).

Por el contrario, los virus lisogénicos efectúan el ciclo lisogénico que es aquel en el que el virus una vez que introduce su material genético no se multiplicará inmediatamente, sino que se integrará en el ADN de la célula hospedadora, pudiendo permanecer durante varias generaciones de la célula en un estado atenuado, hasta que algún factor externo active el ciclo productivo finalizando este estado de latencia (Vargas, 2016).

Las partículas virales pueden clasificarse según diversas características como puede ser el sistema u órgano al que infecten. La taxonomía de los virus tiene en cuenta propiedades antigénicas, biológicas y del virión y es un campo en el que se ha evolucionado mucho en los últimos años. Tras la creación en 1973 del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) se procedió a la clasificación de estos en distintos grupos a través de ciertas normas dictadas por sus componentes, teniendo lugar una reunión cada 4 años donde proceden a la revisión de estos dictámenes (Andrade et al., 2016).

De forma general los virus se dividen en dos grandes grupos, virus de ADN y virus de ARN y teniéndose en cuenta otras características estructurales o funcionales podremos englobarlos en clases, familias, ordenes (con un total de 6), géneros, especies e incluso serotipos (Andrade et al., 2016).

Si se tiene en cuenta el modo de transmisión de los virus obtenemos otra forma de clasificarlos, dando lugar a otros grupos como es el caso de los arbovirus que dependen de un vector para su transmisión (Andrade et al., 2016).

1.2. Arbovirus

Los arbovirus son aquellos virus transmitidos por artrópodos. Como se puede observar en la figura 1, de forma general presentan un ciclo enzótico o selvático en el que la transmisión tiene lugar entre vectores artrópodos hematófagos (intermediario) y un huésped definitivo vertebrado. También es posible un ciclo epizootico o rural entre los vectores característicos y animales domésticos. Por último, si el ser humano entra en contacto con alguno de los ciclos anteriores de manera accidental, puede tener lugar un ciclo urbano en el cual la transmisión ocurre entre humanos y vectores. Este ciclo es el que contribuye al comienzo de una epidemia, pero en el cual el ser humano no tiene capacidad de transmitir el virus. Por ello para mantener la enfermedad es muy importante el ciclo selvático en el que el virus se amplificará en los hospedadores vertebrados (Andrade et al., 2016; Barzo., 2018; Hammami et al., 2020); Hernández et al., 2009).

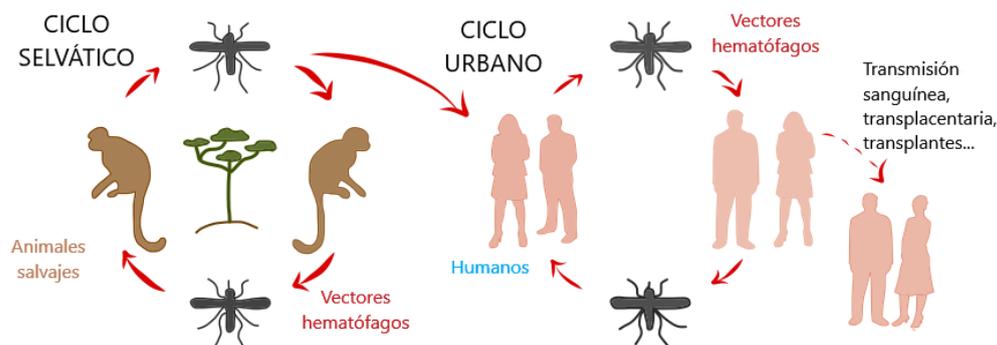


Figura 1. Ciclo de transmisión de los arbovirus. Modificado de Instituto de Salud Global de Barcelona.

De los distintos vectores hematófagos implicados en el ciclo de transmisión encontramos mosquitos, flebótomos y garrapatas que transportan las partículas virales en su interior. Tras la ingestión de sangre pasan al tracto digestivo e infectan células epiteliales, se replican y se conducen hacia el hemocele o cavidad corporal abierta a través del cual pasa a múltiples órganos dianas secundarios, entre ellos las glándulas salivales, por ejemplo, donde se depositarán (Guzmán et al., 2020; Forrester et al., 2014; Martín-Acebedes y Vázquez-Calvo, 2017).

Por otro lado, tenemos un grupo heterogéneo de hospedadores vertebrados como aves, murciélagos, caballos, roedores, primates y seres humanos, en cuyos tejidos también podrá multiplicarse (Mustapha, 2020).

Existen más de 100 arbovirus patógenos que se asocian a enfermedades que afectan tanto a animales como a seres humanos. El virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del dengue (DENV),

el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus de chikunguña (CHIK) (CHIKV), el virus del Zika (ZIKV), el virus hemorrágico de Crimea-Congo y el virus de la encefalitis de Sant Louis (SLEV), son los arbovirus que cobran mayor importancia en salud pública para nosotros los seres humanos, convirtiéndose en una gran carga para la salud mundial. Estos virus son responsables de muchas enfermedades tropicales que se están expandiendo por el resto del mundo (Abdullai et al., 2020; Guzmán et al., 2020; Samuel y Adelma, 2018; Merle et al., 2018).

Los arbovirus no forman parte de un solo grupo filogenético, sino que son un conjunto de virus de distintas familias que comparten su forma de transmisión (Alejo-Cancho et al., 2020).

Desde un punto de vista taxonómico, el termino arbovirus no tiene importancia, compartiendo únicamente características biológicas y ecológicas, pero es un término que se usa para describir a aquellos virus que son transmitidos por artrópodos. Se conoce que existen aproximadamente 135 arbovirus que infectan a humanos. Las familias que incluyen arbovirus son las familias *Togaviridae*, *Flaviviridae* y *Bunyaviridae*. Estas causan enfermedades que pueden ir desde un proceso febril sin importancia hasta una encefalitis, hemorragias de órganos o tejidos, teratogenia e incluso la muerte, tanto en las personas como en los animales. Sin embargo, de las infecciones humanas, la gran parte es asintomática o subclínica (Alejo-Cancho et al., 2020; Andrade et al., 2016; Barzon, 2018).

Debido a la capacidad de estos virus para producir de forma imprevista epidemias generalizadas, están considerados un problema de salud pública de noble importancia (Esser et al., 2019). Por ello es obligatorio notificar todas estas enfermedades, independientemente del lugar de adquisición (Merle et al., 2018).

Los arbovirus son endémicos en Europa expandiéndose por todo el continente originando múltiples brotes en humanos (Barzon, 2018), entendiéndose como brote epidémico aquella aparición repentina de una enfermedad debido a una infección en un lugar específico y un momento determinado (Pulido, 2012).

El auge de las enfermedades producidas por arbovirus implica factores relacionados con el virus (como la virulencia y adaptación, así como migraciones descontroladas), con los humanos (incremento de viajes a países endémicos, transporte, urbanización, comercio, deforestación) y el medioambiente (temperatura, humedad, precipitación, viento y cambio climático) (Abdullai et al., 2020; López-Vélez y Molina, 2005; Papa, 2019).

Así pues, el aumento de población provoca un mayor desarrollo económico, social y tecnológico produciendo cambios en el medio ambiente, urbanizando, haciendo un uso diferente del que

había antes de la tierra y el agua, nuevas prácticas agrícolas y la deforestación. Todo esto provoca una alteración en el ecosistema natural invadiendo este al ecosistema urbano y viceversa. Como consecuencia hay un contacto más estrecho entre especies exóticas y las personas, haciéndolas más susceptibles a contraer ciertas enfermedades nuevas y expandiéndolas a otras partes geográficas del mundo mediante la movilización, con la posibilidad de aparición de nuevos brotes (Andrade et al., 2016).

Es evidente que el cambio climático, con el consiguiente aumento de las temperaturas, juega un papel muy importante en la expansión de los arbovirus, ya que son virus que necesitan temperaturas cálidas para propagarse y por ello, mientras más aumente la temperatura en todo el mundo, en más zonas se producirá esta proliferación. No obstante, el factor temperatura no es tan importante ni cobra tanto peso en la difusión de los arbovirus como puede ser los cambios demográficos de los que se ha hablado con anterioridad. Debido a todas estas causas es motivo de preocupación el auge en la propagación de estas enfermedades (Andrade et al., 2016).

Para tener un buen dominio de estos virus hay que conocer muy bien cuales son aquellas zonas endémicas, potenciando las actividades de control en esas zonas, lo cual requiere un conocimiento muy amplio de todos los factores ecológicos que los engloban, dificultando aún más el proceso. Por ejemplo, que haya más o menos vectores depende por una parte de los posibles hábitats que se encuentren disponibles o de qué y cuantos hospedadores vertebrados haya presente para alimentarse, que por otra parte contribuyen a la dispersión del virus (Esser et al., 2019).

En este Trabajo Fin de Grado nos hemos centrado en uno de los arbovirus más representativos en el mundo, el virus del Nilo Occidental (VNO). Recientemente se han notificado casos de mayor virulencia en Europa y en regiones bañadas por el mediterráneo (Alsaleh et al., 2016), que se caracterizan por veranos secos sin pluviosidad e inviernos húmedos y suaves, además de numerosos humedales presentes en estas zonas que forman parte del paso de miles de aves migratorias un par de veces al año con un alto riesgo de portar dicho virus (Papa, 2019).

El VNO está ampliando su distribución geográfica al igual que sus vectores, estando la población humana más expuesta a ellos, a lo que habrá que sumar el auge de los viajes a zonas endémicas, el comercio, la urbanización y por tanto la densidad de población, la socioeconomía y los cambios climáticos (Alsaleh et al., 2016).

2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado es la realización de una revisión bibliográfica sobre el Virus del Nilo Occidental analizando los avances existentes de los últimos años.

La elección de este tema ha venido precedida de un mayor interés en el conocimiento de este patógeno debido a los últimos casos producidos en Andalucía, concretamente en Sevilla, en el pasado año 2020. Siendo ya recurrente su presencia, no solo en esta región, si no en el resto del mundo, es considerado el arbovirus más repartido por toda La Tierra y la causa de encefalitis producida por virus más importante en todo el mundo.

Para el desarrollo de este objetivo general, se abordarán los siguientes objetivos concretos:

- Descripción del virus tanto su estructura como el mecanismo de infección y transmisión del mismo.
- Analizar la epidemiología producida en todo el mundo a lo largo de la historia del virus.
- Describir la patología de la enfermedad causada por el virus del Nilo Occidental.
- Revisar el tratamiento y métodos de diagnósticos que se encuentran disponibles.
- Analizar las medidas de prevención y vigilancia contra el virus.

3. METODOLOGÍA

La metodología llevada a cabo en esta revisión bibliográfica ha sido la búsqueda de artículos en la base de datos PubMed, el acceso a recursos electrónicos a través del catálogo de la biblioteca de la Universidad de Sevilla, Fama+ y la consulta a diferentes organizaciones oficiales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y World Organization for Animal Health (OIE). También se ha accedido a la página del Ministerio de Sanidad y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España, así como el Boletín Oficial del Estado (BOE). Por último, se han consultado noticias de interés en medios de comunicación como diversos periódicos.

La búsqueda se ha hecho a través de las siguientes palabras claves: 'virus', 'Arbovirus', 'flavivirus', 'Virus del Nilo Occidental', 'West Nile Virus', 'Fiebre del Nilo Occidental', 'vacunas', 'antivirales', 'tratamiento', 'diagnóstico', 'epidemiología', 'brotos', 'culex', 'mecanismo de transmisión', 'receptor'.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Virus del Nilo Occidental

El VNO es un arbovirus neurotrópico incluido dentro de la familia *Flaviviridae* en el género *Flavivirus*. Este género está formado por más de 70 especies, divididos en dos grupos diferentes de virus, los transmitidos por garrapatas y los transmitidos por mosquitos, siendo los de mayor importancia médica en humanos el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus del dengue (DENV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), el virus de la enfermedad del bosque de Kyasanur (KFDV), el virus de la fiebre hemorrágica de Omsk (OHFV), el virus del louping ill (LIV) y el virus del Zika (ZIKV) (Beck et al., 2012; Eyer et al., 2017; Holbrook, 2017; Martín-Acebez et al., 2016).

Todas las especies englobadas en el género *Flavivirus* comparten 3 características en común: la organización de su material genético es idéntica, la forma de procesar poliproteínas es muy parecida y todos tienen una estructura tridimensional (Araujo, 2020).

Aun cuando el conocimiento existente sobre estos virus es bastante amplio, siguen siendo necesarias medidas de control para combatir con estos patógenos y avances en el desarrollo de vacunas y terapias antivirales específicas (Petersen et al., 2013).

4.2. Historia del virus del Nilo Occidental

El virus del Nilo Occidental fue aislado por primera vez en Uganda, en la rivera del Nilo Occidental en 1937, de sangre de una mujer con enfermedad febril (Alsaleh et al., 2016; Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2017; Osvaldo y Merino, 2012; Parkash et al., 2019).

El VNO fue descubierto y designado por la misma persona, Smithburn, un científico que se encontraba en Uganda investigando sobre el origen de la enfermedad del sueño (Corrales-Aguilar, 2014).

Hay evidencias de que desde la década de 1950 el VNO lleva circulando libremente fuera de su hábitat original (Rizzoli et al., 2020).

Durante 20 años o más el VNO estuvo ausente en Europa, apareciendo de nuevo en 1996 en Rumanía, y de ahí se expandió al resto del continente europeo. Sin embargo, no fue hasta 1999 cuando se consiguió aislar en el continente americano de un flamenco muerto procedente de Chile en Nueva York y fue cuando se correlacionó con la enfermedad neuro invasiva,

propagándose por todo el hemisferio occidental de EE. UU, convirtiéndose en la mayor epidemia por VNO en los últimos años ya que antes de la década de los 90 era una enfermedad que carecía de importancia (Alsaleh et al., 2016; De Filette et al., 2012; Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014; Parkash et al., 2019).

Igualmente, por entonces se consiguió obtener, a partir de muestras de cerebro de humanos fallecidos, la secuencia genética completa de ARN del VNO (Hernández et al, 2009).

Concretamente en España el virus empezó a circular a partir de 1970 por el país. Las epidemias fueron eventuales y limitadas hasta 1990 en la cuenca mediterránea, pero a partir de entonces fue creciendo considerablemente e intensificándose la gravedad de la enfermedad, así como los casos de meningitis y encefalitis, con un total de 1.500 muertes reconocidas por este virus (Abdullai et al., 2020; Alsaleh et al., 2016; Ulbert, 2019; Roiz et al., 2012).

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), a fecha 29 de enero de 2021, existen brotes activos dentro de la Unión Europea en Alemania, Bulgaria y Grecia además de focos activos en España, Francia, Hungría, Italia y Portugal (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021).

En la tabla 1 se resumen los distintos brotes producidos por el VNO en el mundo a lo largo de su historia evolutiva.

Tabla 1. Brotes producidos por el VNO en todo el mundo.

AÑO	PAÍS	REFERENCIA
1957	Israel	(Cerrada, 2004)
1962	Francia	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)
1966	Malasia	(Alsaleh et al., 2016)
1972	Portugal	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)
1974	Sudáfrica	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)
1974	Eslovaquia	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)
1974	Moldavia	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)
1975	Ucrania	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)
1976	Hungría	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)
1994	Argelia	(Carrada, 2004)
1996	Marruecos	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)
1996	Rumania	(Bernabeu-Wittel et al., 2007)
1997	Túnez	(Carrada, 2004)
1997	República Checa	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)
1998	República Democrática del Congo	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)

AÑO	PAÍS	REFERENCIA
1998	Congo	(Carrada, 2004)
1998	Italia	(Hernández et al., 2009)
1998	Isarel	(Alsaleh et al., 2016)
1999	Nueva York	(Alsaleh et al., 2016)
1999	Rusia	(De Filette et al., 2012)
1999-2004	EE. UU.	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)
2000	Israel	(Valero, 2003)
2001-2003	El Salvador	(Hernández et al., 2009)
2002	Misisipi y Ohio	(Carrada, 2004)
2002	Canadá	(Hernández et al., 2009)
2002-2003	México	(Carrada, 2004)
2003	Francia	(Hernández, 2009)
2003	Marruecos	(Hernández et al., 2009)
2003	Kenitra	(Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014)
2003	Belice	(Hernández et al., 2009)
2003	Bahamas	(Hernández et al., 2009)
2003-2004	Guatemala	(Hernández et al., 2009)
2004	España	(Alejo-Cancho et al., 2020)
2004-2007	Rusia	(Donadieu et al., 2013)
2005-2010	Israel	(Donadieu et al., 2013)
2006	Argentina	(Hernández et al., 2009)
2010	Grecia	(Vázquez et al., 2011)
2010	Rumanía y Grecia	(De Filette et al., 2012)
2012	Túnez	(Donadieu et al., 2013)
2012	Israel	(Donadieu et al., 2013)
2013	República Checa	(Rizzoli et al., 2020)
2013	Atlanta	(Donadieu et al., 2013)
2016	España	(Alejo-Cancho et al., 2020)
2018	Italia	(Sinigaglia et al., 2019)
2020	España	(Ministerio de Sanidad, 2020)

Desde 2010 los brotes han ido en aumento con una elevada actividad viral probablemente debido a cambios en las temperaturas y precipitaciones, abundantes y prolongadas, con inundaciones en verano favoreciendo las nuevas generaciones de mosquitos, además de otros factores (Papa, 2019). No obstante, la relación entre la temperatura y la transmisión viral es complicada ya que influyen múltiples causas como la ecología y biología de los vectores, componentes relacionados con los huéspedes y el virus (Ciota et al., 2019).

Actualmente el VNO es una clara amenaza para la salud pública, debido a su alta capacidad para producir brotes en áreas que han sido endémicas, la adaptación a distintas especies de vectores y de huéspedes y además del potencial para mutar hacia una suma virulencia. Todo esto lo convierte en un virus que produce epidemias imprevistas y de enorme envergadura (Ulbert, 2019).

4.3. Características del virus del Nilo Occidental

El VNO, mostrado en la figura 2, es un virus que posee simetría icosaédrica con una envoltura de 50 nm de diámetro salvando en su interior un genoma de ARN monocatenario de 11 kb y de sentido positivo (su secuencia de bases es idéntica al ARNm viral), con un único marco de lectura entre dos regiones estructurales no traducidas (UTR), entre sus extremos 5' y 3'. Ejerce de ARNm en la célula infectada y tras su traducción se origina una única poliproteína que se divide en tres proteínas estructurales y siete no estructurales (Alsaleh et al., 2016; Guzmán et al., 2020; Hasan et al., 2019; Martín-Acebes et al., 2016).

Las **proteínas estructurales** son: las proteínas de la cápside (C), el precursor de la membrana (prM) y las proteínas de la envoltura identificadas como glicoproteínas (E). Estas posteriormente se asocian para formar las partículas virales (Martín-Acebes et al., 2016).

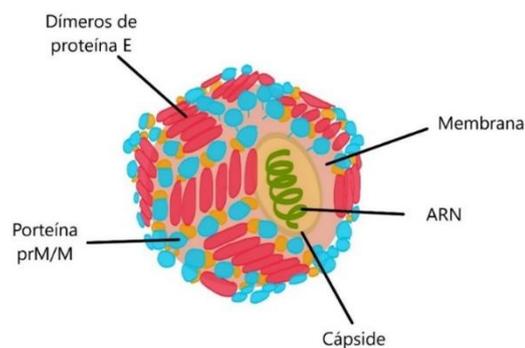


Figura 2. Estructura del VNO. Modificado de Chancey et al., 2015.

Esta poliproteína a su vez origina también **proteínas no estructurales**, concretamente 7 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5), necesarias para la transcripción, traducción, replicación y ensamblaje del virus, que se acoplan en la membrana de la célula hospedadora (Alsaleh et al., 2016; Pesko y Ebel, 2012).

Concretamente la **NS1** tiene una función muy importante en la replicación y la respuesta inmunitaria y es capaz de adquirir 3 formas, monómero, dímero y hexágono (Rastogi et al., 2016). Además, esta proteína NS1 produce ciertas alteraciones en células endoteliales del cerebro potenciando la hiperpermeabilidad en ellas y una disfunción vascular lo que pone de manifiesto hacia donde está dirigida la enfermedad (Puerta-Guardo et al., 2019).

La NS2 se divide a su vez en NS2A encargada de la replicación del ARN y la evasión de la respuesta inmune y NS2B que actúa de cofactor de la proteína NS3 ayudando a su plegamiento y actividad catalítica, es decir, de la proteasa viral principal.

La NS4 también está dividida en NS4A con la misma función que NS2B y la NS4B ejerciendo la misma función que la NS2A.

Y, por último, la NS5 es la proteína NS más grande y está implicada en la síntesis y modificación de ARN (Hasan et al., 2018).

La **glicoproteína E**, es una hemaglutinina viral, es el principal componente de la envoltura lipídica del virus, encontrándose en la zona más externa formando dímeros. Tiene mucha importancia en la virulencia ya que se une al receptor mediando la entrada y fusión con la membrana de la célula hospedadora, etapa necesaria para acceder a la célula. Esto es un punto clave a conocer para poder diseñar tareas preventivas y terapéuticas, ya que esta glicoproteína E, además, presenta propiedades inmunogénicas protectoras hacia donde van dirigidos los anticuerpos neutralizantes. La glicoproteína E consta de tres dominios estructurales (DI, DII, DIII) conectados entre sí por regiones de bisagras flexibles, en el que el dominio III tiene una estructura parecida a una inmunoglobulina formada por epítopos diferentes que son los identificados por los anticuerpos neutralizantes. No obstante, para obtener una respuesta inmune eficaz que nos proteja frente al VNO es necesario poseer una inmunidad innata y adaptativa previa bien desarrollada (Alsaleh et al., 2016; De Filette, 2012; Izaguirre et al, 2003; Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014; Martín-Acebes et al., 2016; Saiz, 2020; Smit et al., 2011).

El VNO puede replicarse en varios tipos de líneas celulares y en distintas especies animales, por tanto, o estos receptores que median la entrada están altamente conservados o bien el VNO puede ser reconocido por distintas proteínas receptoras (Brinton, 2014).

El tropismo del VNO en los seres humanos va dirigido hacia macrófagos, células dendríticas, células endoteliales y neuronas. Una vez que se produce la glicosilación de las proteínas prM o E del virus ocurre la interacción del VNO con el receptor, DC-SIGN y DC-SIGNR de las células dendríticas, pero además también hay interacción de la fosfatidilserina del virus con fosfatidilserina de la familia de proteínas TIM y TAM, dos familias de receptores que median la eliminación fagocítica, en otras líneas celulares como los glóbulos rojos. La integrina α y β_3 (expresadas en células de mamíferos) interactúan con el VNO, aunque en menor medida, pero no son imprescindibles, por el contrario, la presencia de las proteínas de la familia del receptor de quinasa acoplado a proteína G (GRK) si es esencial para la incorporación del VNO a la célula (Brinton, 2014; Meertens et al., 2012; Smit et al., 2011).

Se conoce que las proteínas E y prM en el VNO están glicosiladas. Esto influye en la eficacia que tiene el virus para liberarse y también en la capacidad de infectar. Por lo tanto, si la glicosilación por alguna causa es menor en un momento determinado se liberarán menos partículas virales. Esto nos lleva a la conclusión de que la glicosilación afectará tanto al huésped como a la supervivencia del propio virus (Vigerust et al., 2007).

Asimismo, podemos diferenciar formas maduras e inmaduras del virus. Los viriones inmaduros estarán formados por el precursor prM y la proteína E, y los maduros por la proteína M (que tiene lugar de la separación proteolítica del precursor prM durante la maduración) y la proteína E donde ya sí se permite la organización de esta en dímeros antiparalelos, pasando de una conformación irregular y más suelta a una lisa y unida (Araujo et al., 2020; Hammami y Ben, 2020), tal y como se puede observar en la figura 3.

Una vez que tiene lugar toda la cascada de replicación, ensamblaje y maduración, los viriones maduros serán excretados al medio extracelular mediante exocitosis (Hammami y Ben, 2020).

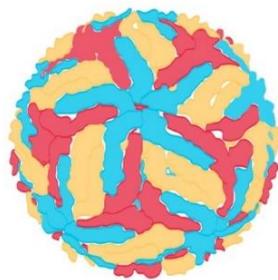


Figura 3. Virión maduro del VNO. Modificado de Martin-Acebedes et al., 2016.

4.4. Ciclo multiplicativo o infeccioso del virus del Nilo Occidental

Durante la maduración de los viriones tienen lugar cambios conformacionales en la estructura, también hay cambios de reconocimiento por parte de la célula huésped y en la fusión del virus con la célula para entrar en ella. La temperatura participa, en parte, en toda esta transición (Hasan et al., 2019).

El virión por tanto está formado por un núcleo central, la nucleocápside, que engloba la cápside con el material genético en su interior, envuelta por una bicapa lipídica que proviene de la célula huésped y que permite el anclaje de 60 picos heterotriméricos de proteínas prM y glicoproteínas E (De Filette et al., 2012; Martín-Acebes et al., 2016).

Una vez que la partícula viral se une al receptor correspondiente de la célula que va a infectar, los endosomas celulares la envuelven mediante endocitosis mediada por clatrina. Debido al pH

ácido del lumen endosomal, que le aporta la energía necesaria para la fusión, se produce un reordenamiento de la proteína E dando lugar a ciertas protuberancias hidrofóbicas promoviendo la fusión con la membrana. Dicha fusión da paso a la liberación del genoma en el citoplasma celular que dará lugar a nuevas partículas de virus gracias a la maquinaria de la célula hospedadora y que madurarán antes de su liberación al medio extracelular (De Filette et al., 2012; Kanai et al., 2006). La **replicación** se produce en 2 etapas:

1. **Primera etapa** en la cual el ARN de cadena positiva actúa como un ARNm, que se traduce y escinde en el interior del retículo endoplasmático de la célula hospedadora gracias a proteasas virales.
2. La siguiente y **última etapa** consiste en la formación de las múltiples copias de ARN, dando lugar a las proteínas virales inmaduras que, a través de proteasas existentes en las vesículas del complejo de Golgi, como la furina, maduran y se excretan al exterior (Esser et al., 2019; Okamoto et al., 2017).

El factor que determinará el éxito de la replicación dependerá de cuánto se haya apropiado el virus de la maquinaria del hospedador, necesaria para la traducción, y de la eficacia del proceso (Valdez et al., 2019).

Toda esta sucesión de acontecimientos se encuentra representada en la figura 4.

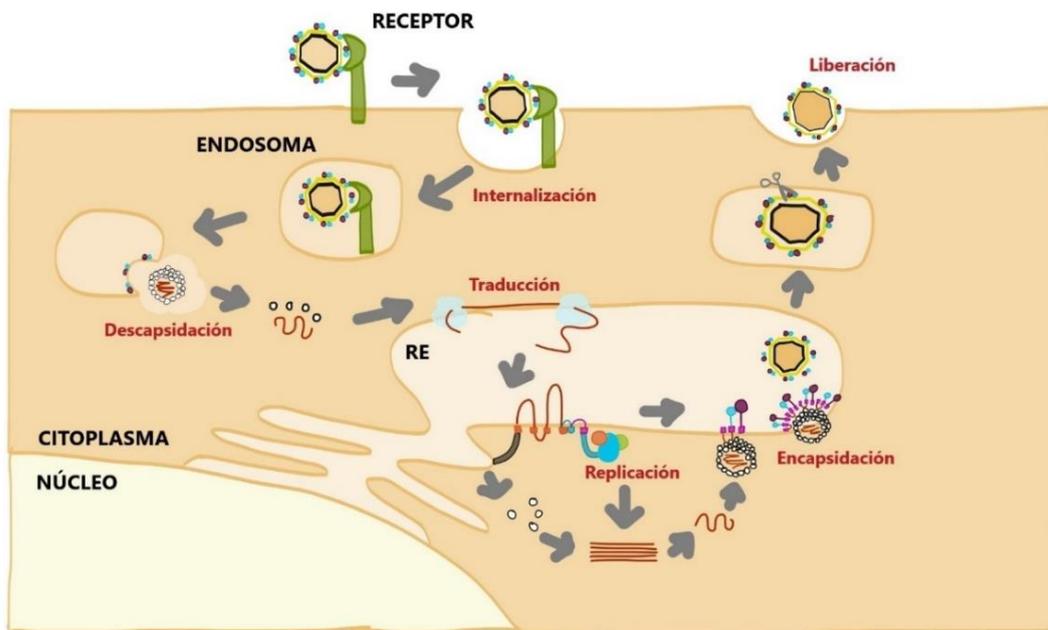


Figura 4. Mecanismo de infección del VNO. Modificado de Okamoto et al., 2017.

Algunas fuentes expresan que tras la inoculación del virus por parte del mosquito primero penetra con la saliva en la epidermis y genera una función inmunomoduladora que ayuda a la replicación en las células dendríticas, queratinocitos y de Langerhans, las cuales difunden a los ganglios linfáticos, drenan al torrente sanguíneo (que se corresponde con la etapa febril), y tiene lugar la viremia primaria donde se disemina a tejidos periféricos tales como el riñón y el bazo y de ahí a órganos viscerales pudiendo traspasar la BHE y penetrar en el SNC (De Filette et al., 2012; Ashhurst et al., 2013; Villalobos, 2015; Vonesch et al., 2019).

En el SNC origina la muerte de neuronas inespecíficas, lesionando a nivel medular las motoneuronas del asta anterior, en la médula espinal y la materia gris del tronco del encéfalo. La afección al SNC depende de la neuro virulencia, que es la capacidad de producir la enfermedad, y neuro invasividad que tiene lugar a través de varios mecanismos como: aumento de la permeabilidad vascular por citocinas y paso directo a través de la BHE, paso paracelular por el endotelio de la BHE, transporte de macrófagos tisulares infectados que atraviesan la BHE con entrada de leucocitos en el cerebro y transporte al sistema nervioso mediante la infección de neuronas periféricas u olfativas (Clark y Schaefer, 2020; Ashhurst et al., 2013; Petersen et al., 2013; Villalobos, 2015).

La inflamación del SNC está desencadenada por la liberación de citocinas y quimiocinas por parte de las neuronas infectadas, dando lugar a la invasión de leucocitos (Lim et al., 2011).

Existe un mecanismo de defensa por parte de las células infectadas que consiste en la muerte celular programada (apoptosis) mediante la activación de ciertas caspasas, lo que permite la eliminación de células dañadas o innecesarias. Sin embargo, esto puede tener connotación positiva y negativa. Por un lado, tendrá un efecto antiviral en el cuál morirán aquellas células infectadas, pero por otro lado si ocurre en células que no se renuevan con tanta facilidad como las neuronas, puede conllevar efectos patológicos negativos (Cho y Diamon, 2012; Lim et al., 2011; Okamoto et al., 2019).

En la infección por el VNO se sabe que la inmunidad innata es imprescindible para evitar la replicación masiva del virus, que la enfermedad progrese a estadios más severos y además para preparar a la inmunidad protectora humoral mediada por células (Quicke y Suthar, 2013).

Según su secuencia de nucleótidos se diferencian hasta 8 linajes, motivo de controversia en los últimos tiempos, no obstante, la mayoría pertenece a los dos principales, el linaje 1 y el linaje 2 (Alsaleh et al. 2016; Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014; Pérez-Ramírez et al., 2017).

El linaje 1, que se compone a su vez de distintos clados (1a-c) diferenciándose en su virulencia y patogenicidad, se ha encontrado principalmente en África, Europa, Oriente Medio, Asia, Oceanía y América del Norte además de India y Australia produciendo los recientes brotes y epizootias. Mientras que el linaje 2 procede en su mayoría de África subsahariana y Madagascar además de cepas aisladas en Europa últimamente desde Hungría, hasta Rusia e Italia. El linaje 2 fue considerado al principio de menos patogenicidad que el 1, sin embargo, en estudios posteriores se demostró que no está exento de producir la enfermedad neuro invasiva ya que la virulencia depende más de la cepa que del linaje, además actualmente se considera responsable de la mayoría de los casos humanos producidos en Europa (Ministerio de Sanidad, 2020). Todo esto se encuentra aún en estudio y necesita de una mayor investigación. Investigaciones recientes han concluido que el VNO está presente en todo el mundo exceptuando el continente de la Antártida, como se puede percibir en la figura 5 (Alsaleh et al., 2016; Esser et al., 2019; Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014; Parkash et al., 2019; Pérez-Ramírez et al., 2017).

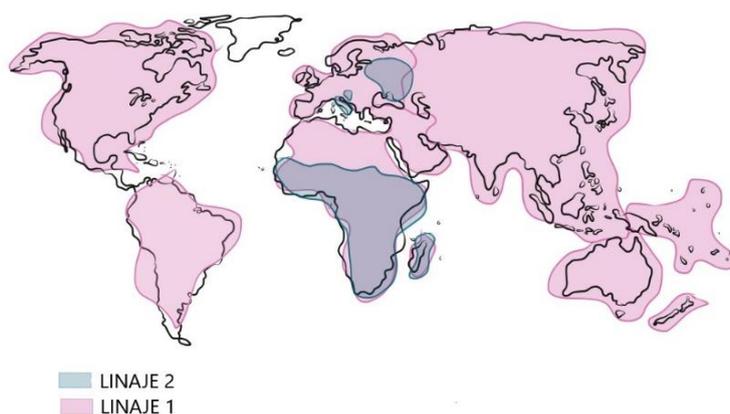


Figura 5. Representación mundial de los linajes 1 y 2 del VNO. Modificado de Pesko y Ebel, 2012.

Al fin y al cabo, el VNO está ampliamente distribuido tanto geográfica como genéticamente en el continente africano, siendo este la fuente de todas las cepas que están repartidas por todo el mundo (Donadieu et al, 2013).

Infecta a distintos tipos de animales vertebrados como el caballo y el ser humano. Se caracteriza por ser un virus capaz de infectar el SNC causando una enfermedad neurológica grave (Donadieu et al, 2013).

Tiene un ciclo de transmisión enzótico entre mosquitos del género **Culex**, específicamente **Culex pipiens** (figura 6a), **Culex univittatus**, **Culex restuans** (figura 6b) y **Culex tarsalis** (figura 6c) y aves de diferentes especies migratorias. El VNO ha sido también aislado de especies de otros géneros de mosquitos como **Aedes**, **Anopheles**, **Coquillettidia** y **Ochlerotatus**. Estos mosquitos pueden

contagiar a seres humanos, caballos y otros mamíferos convirtiéndose en huéspedes sin salida, porque no alcanzan una viremia suficiente como para transmitir el virus. Podríamos por lo tanto deducir que el ciclo principal de transmisión es mosquito-ave-mosquito (Barzon, 2018; De Filette et al., 2012; Gould y Fikrig, 2004; Hammami y Ben, 2020).



Figura 6: a, *Culex pipiens*; b, *Culex restuans*; c, *Culex tarsalis* (Burkett, 2013; Cortes A, 2020).

El vector es más activo, y por tanto hay un mayor riesgo de infección por VNO, durante los meses que comprenden desde abril hasta noviembre, en concreto al final del verano casi ya entrando en otoño. Durante el resto del año, este riesgo es muy bajo. Esto es debido a que es el momento en el que las aves ya han emigrado y el mosquito necesita otra fuente de alimentación de un hospedador vertebrado recurriendo a los humanos (Ministerio de Sanidad, 2020). Sin embargo, en países tropicales el patrón de actividad es casi constante durante todo el año, pero sobre todo en periodos de lluvia (Izaguirre et al., 2003).

Factores como las precipitaciones, la temperatura o incluso que coincida una densidad de población suficiente de vectores y posibles huéspedes, va a determinar que en una zona haya o no VNO. Mientras que las altas temperaturas se relacionan directamente con un aumento en la presencia de VNO, las precipitaciones no siempre son adecuadas, dependerá del hábitat que estemos considerando ya que la ausencia de estas puede favorecer la creación de charcos de agua estancada que favorece la cría de los mosquitos y en otras ocasiones la abundancia de precipitaciones produce un hábitat posible donde antes no lo había y aumenta la incidencia (Esser et al., 2019). No obstante, para una temperatura inferior a 20°C en verano la transmisión será nula. Cuanto más tiempo permanezcan las condiciones climáticas favorables para el virus, mayor durará el periodo de tiempo en el que este esté activo (López-Vélez, 2005).

No podemos olvidar que la adaptación de los mosquitos en distintas áreas geográficas del mundo es diferente y que la relación que existe entre el VNO y algunos factores intrínseco o extrínseco de los componentes del ciclo de vida pueden variar (Esser et al., 2019).

Tras un periodo de incubación de 2 a 15 días (aunque puede llegar a los 21 días), el paciente presenta una infección que suele ser asintomática o subclínica, en el 80% de los casos aproximadamente, con una duración de 2 a 5 días, si existen síntomas se caracteriza por presentarse de forma súbita un cuadro psuedogripal denominado “fiebre del Nilo Occidental” (FNO), y solo en el 1% de los casos da lugar a una enfermedad neuro invasiva que puede tener consecuencias a largo plazo como pérdida de memoria, parálisis, cambios de personalidad, debilidad muscular (que recuerda al síndrome de Guillain-Barre), rigidez nuchal, producir un coma o ser mortal. La neuroinvasividad puede manifestarse como encefalitis (inflamación del cerebro), parálisis flácida aguda (también conocida como síndrome polio-like) prácticamente única por este virus, que tiene lugar por el daño medular de las astas anteriores generando a una atrofia perceptible, meningitis (inflamación de las meninges y la médula espinal) o incluso hepatitis. Es bastante frecuente que aparezcan trastornos extrapiramidales, como temblor en las extremidades, que recuerdan a la enfermedad del Parkinson, conociéndose como el fenómeno del parkinsonismo secundario. Posiblemente la ansiedad, depresión y desidia son algunas de las secuelas que pueden quedar tras la infección por VNO (Abdullai et al., 2020; Barzon, 2018; Esser et al., 2019; Goodman, 2012; Guzmán et al., 2020; Jang et al., 2009; Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014; Papa, 2019; Parkash et al., 2019; Petersen et al., 2013; Saiz, 2020; Villalobos, 2015).

Aunque no es lo más común, un conjunto de pacientes ha mostrado complicaciones oculares, llegando desde el cerebro a través del nervio óptico (Ashhurst et al., 2013).

Los síntomas de la enfermedad leve suelen ser similares a un cuadro gripal como hemos mencionado anteriormente, acompañado de: fiebre, dolor de cabeza, fatiga, a veces exantema, dolor muscular, náuseas o vómitos y linfadenopatía. Algunos de estos síntomas son compartidos con otras infecciones por distintos virus del género *Flavivirus*, lo que a veces conduce a un diagnóstico erróneo (Guzmán et al., 2020; Izaguirre et al., 2003; Papa., 2019; Villalobos, 2015).

En aquellos casos donde no ha habido daño en el SNC por lo general el pronóstico es favorable y en un bajo porcentaje de los casos puede permanecer un síndrome de fatiga crónica. La presencia de meningitis no es un problema para la recuperación del paciente, por el contrario, la encefalitis tiene más probabilidad de generar secuelas y la parálisis flácida solo permite a un tercio de los enfermos su recuperación (Villalobos, 2015).

Cuando el virus afecta al SNC, suelen aparecer úlceras por presión, aspiración y trombosis venosa profunda debido a que muchos pacientes quedan postrados en la cama (Clark y Schaefer, 2020).

La proporción más alta de virus en sangre se consigue a los 4-8 días de la primoinfección. La persona se recupera con normalidad casi siempre y la infección conlleva a la adquisición de inmunidad perdurable en el tiempo (Esser et al., 2019).

Los jóvenes son más propensos a desarrollar la enfermedad por el VNO, sin embargo, el riesgo de neuroinvasividad afecta principalmente a personas de edad avanzada, niños e inmunodeprimidos, también aquellos con una patología de base como diabetes, hipertensión, enfermedad renal y otras, así como el sexo masculino, los cuales tienen una mayor probabilidad de padecer un síndrome neurológico. Además, aquellas personas que viven en zonas rurales tienen más posibilidad de infectarse por el virus por su proximidad al ciclo salvaje y humedales, así como aquellas que se dedican profesionalmente a actividades de riesgo para su contagio (Barzon, 2018; Beck et al., 2013; Bernabeu-Wittel et al., 2007; Esser et al., 2019; Loeb, 2013; Petersen et al., 2013).

4.5. ¿Cómo se transmite el VNO?

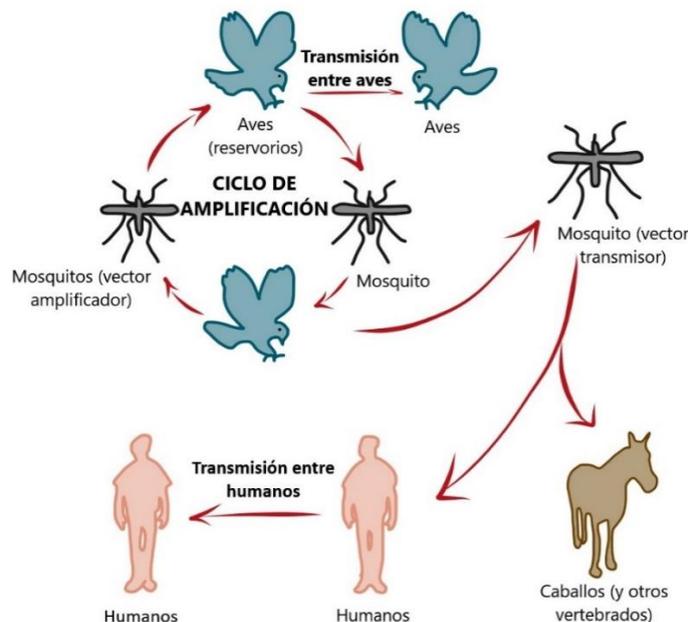


Figura 7. Ciclo de transmisión del VNO. Modificado de Gould y Fikrig, 2004.

El VNO lleva a cabo dos ciclos de transmisión, reproducidos en la figura 7. Un ciclo enzótico primario entre un conjunto de mosquitos vectores y aves amplificadoras, y un ciclo secundario en el que se ven involucrados distintos artrópodos que transmiten el virus a través de sus vectores característicos a humanos y caballos (hospedadores secundario final). En total se sabe que existen en torno a 43 especies de mosquitos (especial importancia las del género *Culex*,

figura 6), y hasta 150 aves capaces de contribuir en el ciclo de infección (Barzon, 2018; Hernández et al., 2009).

Para poder transmitir la enfermedad es necesario que en el huésped se genere una carga viral suficientemente alta como para que una vez que el mosquito pique pueda ser infectado y este actuar como vector, este papel lo desempeña fundamentalmente las aves, algún ejemplo serían los arrendajos azules, los cuervos americanos, gorriones y los zarcillos, denominados todos aves paseriformes o pájaros (Abdullai et al., 2020). Por tanto, actuarán como huéspedes aquellas aves que sean capaces de desarrollar una viremia suficiente para la propagación de la enfermedad (Corrales-Aguilar, 2014).

Pero no solo las aves pueden ser infectadas, otros vertebrados como anfibios, reptiles y mamíferos puede contagiarse y transmitir el VNO. Una excepción sería los humanos y caballos, que no tienen capacidad de desarrollar una viremia suficiente como para que al alimentarse un mosquito adquiriera el virus y pueda propagarlo.

Por lo tanto, los humanos y los caballos son considerados huéspedes secundarios ya que no son transmisores como tal, no tienen una viremia suficiente para portar la enfermedad, es decir, no actúan como reservorios a diferencia del resto (Abdullai et al., 2020; Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014).

El mosquito se alimenta de la sangre de vertebrados infectados por el virus, el virus en el mosquito se reproducirá constantemente y la próxima vez que el mosquito vaya a alimentarse, a través de su saliva los inoculará en los nuevos hospedadores vertebrados sanos, estos son capaces de mantener el virus en el organismo en torno a 5 días, tiempo suficiente como para que otro insecto vector se alimente de ellos y se infecte.

Uno de los retos más importantes del VNO es su vigilancia debido a que el ciclo de transmisión entre vertebrados y vectores es complicado y una gran parte de los humanos y demás mamíferos contagiados son huéspedes asintomáticos y sin salida (Papa, 2019).

Teniendo en cuenta que el VNO es un virus cuya ecología está cambiando durante los últimos años, produciendo con anterioridad brotes aislados y esporádicos a dispersarse a zonas no endémicas, hoy en día se considera un patógeno emergente (Bernabeu-Wittel et al., 2007). La propagación del VNO además es superior en países mediterráneos como España, Francia, Túnez, Argelia y Marruecos, siendo la zona decisiva de paso obligado de las aves migratorias entre el continente africano y europeo, y por consiguiente esta enfermedad puede incrementarse en estos países por el cambio climático (López-Vélez et al., 2005). No obstante, es importante

conocer el papel que juegan las aves en este ciclo de transmisión, ya que debe haber buenas condiciones en el nuevo ambiente además de coexistir vectores locales capaces de transmitir el virus de forma apropiada (Valero, 2003).

¿Por qué sucede esto? Los factores climáticos cuentan con una gran responsabilidad. Como dijo entonces Hipócrates: “la salud y la enfermedad en el hombre no solo están en relación con su organismo, sino también con el medio ambiente, especialmente con los fenómenos atmosféricos” (Osvaldo y Merino, 2012).

La transmisión, además de ser principalmente a través de la picadura nocturna de vectores infectados ya mencionados, también tiene riesgo de ser a través de transfusiones de sangre y donación de órganos, tejidos y células, la lactancia materna, transmisión transplacentaria y posiblemente mediante aerosoles. Además, se sospecha que puede haber una transmisión percutánea o conjuntival de trabajadores de laboratorios. Por ello es muy importante contar con programas de vigilancia para prevenir y frenar esta transmisión, sobre todo en aquellas zonas endémicas. Aun así, la transmisión del virus por estas vías tiene una presencia muy pequeña y no se consideran un riesgo para la propagación del VNO (Alejo-Cancho et al., 2020; Barzon, 2018; Papa, 2019; Petersen et al., 2013; Villalobos, 2015; Wiwanitkit, 2009).

El VNO se ha convertido en un asunto tan importante que en EE. UU es el único patógeno, además del virus del Zika, que es examinado en las transfusiones sanguíneas, para evitar esta vía de transmisión (Araujo et al., 2020).

Por otra parte, si animales o mosquitos infectados son consumidos por vertebrados aptos, o las aves entran en contacto con restos fecales de otras aves que contienen el VNO, este puede ser transmitido (Barzon, 2018).

La infección por el VNO en Europa ocurre en aquel periodo donde sus vectores están más activos, que corresponde con los meses de julio hasta septiembre (Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014).

4.6. Prevención

Hoy en día, solo la prevención y el control son los medios que nos aseguran la disminución de la mortalidad y morbimortalidad producida por el VNO (Wiwanitkit, 2009).

Debido a la situación geográfica en la que España se encuentra, siendo un país donde múltiples aves migratorias de países endémicos hacen sus paradas, además del favorable entorno climatológico para la dispersión del VNO ya que cuenta con numerosas zonas húmedas como

los pantanos, lagos o delta de los ríos (hábitat perfecto para las aves y los mosquitos) facilitando aún más la transmisión, es sumamente importante implantar sistemas de vigilancia y prevención.

La vigilancia puede ser activa, que se basa en la detección temprana del virus, o pasiva, una vez que este ya está en circulación.

Para que todos estos sistemas sean eficaces, es necesario que sean globales, integrados, que tengan un buen control de plagas y se facilite información de calidad a la población (Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014).

Por una parte, habrá que vigilar constantemente, aunque no haya enfermedad, para poder obtener un mejor conocimiento sobre los vectores y los reservorios, tanto en su situación geográfica como su hábitat idóneo. Una vez que conocemos esto será más fácil poder incidir en las fuentes de origen, reduciendo aquellas zonas de crías de larvas de mosquitos mediante un control químico o biológico, para reducir las poblaciones de mosquitos. Lo que se hace es administrar una proporción baja de pesticidas a través del aire y en la propia tierra, no produciendo ningún efecto adverso en la salud de la población. Los insecticidas que más se usan son los organofosforados que bloquean de forma irreversible la acetilcolinesterasa, o piretroides sintéticos. La actividad de la fumigación es beneficiosa para evitar que los mosquitos se reproduzcan, además se debe drenar las aguas estancadas ya que es un hábitat perfecto para la propagación de estos (Googman, 2012; Jiménez-Clavero y Sánchez-Seco, 2014; Osvaldo y Merino, 2012; Petersen et al., 2013).

También habría que estar en continua formación sobre estas actividades de control, realizar una adecuada educación higiénico-sanitaria, campañas publicitarias etc, aunque en España el control vectorial no está regulado por la ley (López-Vélez y Molina, 2005).

En España existe la red EVITAR desde 2001, constituido por un equipo multidisciplinar, que trabajan sobre estas enfermedades arbovirales y entre la que se encuentra la producida por el VNO. Así el Plan del Vigilancia del VNO se empezó en 2007 y considera la vigilancia tanto de las aves, mosquitos, humanos y también équidos. De este modo, la encefalomielitis equina producida por el VNO es considerada una enfermedad de declaración obligatoria (EDO) en España (Esser et al., 2019; López-Vélez y Molina, 2005; Real Decreto 526/201, 2014).

La mejor prevención de todas será evitar la picadura del mosquito, por ejemplo, usando métodos de barrera como mosquiteras y repelentes. También es importante evitar la realización de actividades al aire libre cerca de zonas donde el VNO puede estar presente como humedales

o zonas con aguas estancadas en el período de máxima actividad del virus, es decir sobre todo al final de verano y principio del otoño y entre el amanecer y el atardecer. Sería conveniente usar ropa de manga larga al igual que pantalones largos en el que caso que se hagan actividades en estas zonas durante las horas de más dinamismo del mosquito y otra opción sería tratar la ropa con permetrina (Clark y Schaefer, 2020; De Filette, 2012; Goodman, 2012; Hernández et al., 2009; Izaguirre et al., 2003).

En el momento en el que se detecta un caso hay que notificarlo y describirlo rápidamente para poder controlar el brote, así como determinar el área geográfica donde se ha producido esa infección, ya que el empeño deberá dirigirse a aquellas zonas donde es más posible la circulación del virus (Esser et al., 2019; López-Ruiz et al., 2018).

Por otra parte, es necesario un enfoque multidisciplinar que cuente con médicos, enfermeros capacitados en especialidades, farmacéuticos, veterinarios, ya que los animales son un punto fuerte muy importante en estas enfermedades, y profesionales aptos tanto para llevar a cabo estas actividades de prevención y control como aquellas encaminadas a tratar al paciente enfermo (Clark y Schaefer, 2020; López-Ruiz et al., 2018).

Si queremos obtener una inmunización contra el VNO la mejor medida profiláctica de todas las existentes es la vacunación. Sin embargo, hoy en día no hay vacunas aprobadas para este virus por la FDA en seres humanos, algunas se encuentran aún en ensayos clínicos lo que significa que aún quedan varios años para que haya alguna a disposición de la población. Sin embargo, las vacunas sí tuvieron éxito para caballos, con un total de 3 vacunas aprobadas (De Filette et al., 2012), donde podemos encontrar algunas basadas en proteínas recombinantes, replicones de ARN o vectores virales capaces de expresar genes de VNO entre otras (Ulbert, 2019).

De los 6 ensayos en humanos que se han realizado de vacunas, ninguno ha demostrado no ser seguro ni ineficaz, pero todos se han parado y no han progresado más allá de la fase II (Ulbert, 2019). El problema, entre otros, es que es un virus que no podemos predecir cuándo va a aparecer y originar brotes de distinta magnitud para poder realizar ensayos en fase III, lo que dificulta aún más la aprobación de posibles terapias (Araujo et al., 2020).

No obstante, solo dos candidatos recombinantes atenuados desarrollaron una inmunidad fuerte tras una única dosis. Se trata de dos vacunas que expresan las proteínas prM y E del VNO, una de ellas lo hacía en un esqueleto del virus de la fiebre amarilla, **ChimeriVax**, la otra por el contrario en uno del virus del Dengue, **rWN/DEN4Δ30** (Saiz., 2020).

Se hicieron ensayos preclínicos sobre vacunas de subunidades basadas en proteínas recombinantes expresadas en *Escherichia coli*, sin embargo, no fueron capaces de pasar a ensayos clínicos. Esta aplicación tiene algunos problemas a la hora de generar un plegamiento correcto a partir de cuerpos de inclusión y escoger el adyuvante correcto, donde se estudiaron varios de ellos para saber cuál sería el más adecuado y con cuál se obtiene la mejor respuesta inmune. Por lo tanto *E. coli* podría ser un huésped adecuado para elaborar vacunas contra el VNO (Araujo, 2020).

Hay que considerar que la incidencia en la enfermedad neuro invasiva del VNO es muy baja y los costes derivados de la aprobación de la vacuna son muy altos, y en el caso de que se aprobase alguna, esta iría dirigida a aquellos grupos de más riesgo. Además, otras estrategias preventivas son mucho más baratas (De Filette et al., 2012; Ulbert, 2019).

La rentabilidad que puede conllevar la vacunación contra el VNO ha sido estudiada en los EE. UU en dos publicaciones en el año 2006 y 2017. Sin embargo, la conclusión que se obtiene es que el ahorro de costes es poco rentable, ya que los casos son pocos y los costes elevados (Ulbert S., 2019).

En el caso en el que se aprobara una vacuna esta debería ser rentable, segura y eficaz, sobre todo para aquellas personas a las que más le afectara una infección por VNO. Para poder obtener una rentabilidad adecuada, deberá de optimizarse al máximo el proceso para que así los costes de producción sean los más bajos posibles. Además, lo ideal es que la inmunidad se adquiriera con una sola dosis y que esta proporcione protección a largo plazo (Saiz, 2020).

Un punto clave e importante en el desarrollo de una vacuna contra el VNO es que carezca de epítomos que puedan ser reconocidos por anticuerpos presentes en nuestro organismo frente a otros flavivirus (Ulbert., 2019).

4.7. Tratamiento

La aprobación de terapias antivirales contra las especies englobadas en el género *Flavivirus* para humanos aún está en proceso de desarrollo. Existen algunos tratamientos que se han usado en contadas ocasiones y otros que se encuentran aún en fase de estudio. Esto se debe en gran parte a la dificultad para conseguir un número significativo de candidatos a ensayos clínicos (Eyer et al., 2017; Petersen et al., 2013).

A continuación, se mencionarán tratamientos usados en algún momento para la fiebre del Nilo Occidental o aquellos que se encuentran o han estado en fase de desarrollo según la bibliografía disponible.

Uno de ellos es el **BCX4430**, que mostró datos farmacocinéticos y de buena tolerabilidad aceptables en fase 1, que debido a un cambio estructural evita la interacción de la ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5) deteniendo la replicación viral. La ARN polimerasa dependiente de ARN se encarga de originar una cadena negativa que servirá de molde para generar el resto de las copias nuevas de ARN de cadena positiva (De Filette et al., 2012; Eyes et al., 2017).

Otro compuesto es el **favipiravir**, de amplio espectro para distintas familias virales. Se trata de un profármaco, cuyo metabolito activo interacciona con la ARN polimerasa dependiente de ARN como una psuedopurina. Ha demostrado ser eficaz en ensayos realizados en roedores disminuyendo el ARN y la expresión de proteínas del VNO, pero no existen ensayos sobre si es capaz de atravesar la BHE. Este compuesto ha sido aprobado como tratamiento de reserva para la enfermedad de la influenza en Japón (Bologheanu et al., 2020).

También en algunos casos se han usado **ribavirina**, **interferón- α** e **inmunoglobulina**, recomendada por algunos autores para las formas más severas del VNO, pero esto no implica que se hayan realizado ensayos clínicos de estos fármacos para esta enfermedad en concreto (De Filette et al., 2012; Villalobos, 2015). En el caso de la ribavirina los resultados son discordantes, aunque en algunos estudios in vitro se ha visto que inhibe la replicación en las células neurales (Izaguirre et al., 2003).

El **arbidol** o **umifenovir** es un compuesto antiviral cuyo mecanismo de acción consiste en interaccionar con los lípidos de la membrana impidiendo así la fusión de membrana entre el virus y la célula huésped. Este compuesto es autorizado en Rusia y China para la prevención y tratamiento de la infección por el virus de influenza humana A y B, pero además se ha descubierto que es eficaz contra muchos virus de ADN y ARN con y sin envoltura, entre ellos el VNO (Haviernik et al., 2018).

Efavirenz, **tipranavir** y **dasabuvir** son tres fármacos que han sido estudiados y demostraron ser inhibidores a concentraciones micromolares del VNO y el ZIKV, aunque no implica que por ello sean candidatos adecuados para tratar la enfermedad que producen estos virus (Stefanik et al., 2020).

Asimismo, otra alternativa terapéutica sería dirigir el tratamiento hacia aquellos componentes celulares propios del organismo que favorecen la multiplicación del virus ya que son necesarios para su supervivencia. Un ejemplo sería el citoesqueleto que participa en múltiples funciones que hacen posible la entrada del virus en la célula, como introducir sustancias que estos necesitan, el transporte de los endosomas, servir de arma para luchar contra los anticuerpos que quieren acabar con el virus etc. Por lo tanto, si los microtúbulos se rompen, no pueden ejercer su función y muy probablemente se reduciría con éxito la carga viral. Aun así, esto es algo que se sigue estudiando e investigando con más profundidad (Zhang et al., 2019).

Actualmente, el tratamiento del VNO va a ir enfocado a paliar los síntomas y no al ataque del virus, una vez que se ha descartado la posibilidad de otras enfermedades (Guzmán et al., 2020; Martín-Acebes et al., 2016).

Se puede concluir que no existe un tratamiento determinado para la infección por VNO por lo tanto se debe proporcionar un tratamiento de soporte o apoyo (López-Ruiz et al., 2018; Villalobos., 2015). El tratamiento de soporte implica un soporte respiratorio y una prevención y tratamiento de posibles infecciones bacterianas (Hernández et al., 2009).

4.8. Diagnóstico

Antes de llevar a cabo un tratamiento eficaz, se necesita un diagnóstico para conocer la etiología de la enfermedad, basándose en primer lugar en la sospecha clínica y posteriormente la confirmación a través de pruebas de laboratorio (Villalobos, 2015).

El diagnóstico del VNO a través de pruebas de laboratorio consiste en la detección del propio virus o de anticuerpos contra este. No obstante, como la aparición de los síntomas, y por tanto sospecha de haber contraído el virus, no aparece hasta varios días después, las pruebas indirectas o serológicas son las que cobran mayor importancia (Beck et al., 2013; Izaguirre et al., 2003).

Para conocer la presencia del virus en una muestra podemos hacer uso de técnicas virológicas aislando el propio virus, o moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Por otro lado, si lo que queremos es saber si existen anticuerpos contra el VNO en una muestra biológica habrá que hacer uso de técnicas serológicas como ELISA, inhibición de la hemaglutinación (IH), ensayos de inmunofluorescencia (IFA) y seroneutralización.

Hay que tener en cuenta que el ensayo de seroneutralización tiene una sensibilidad prácticamente del 100% siendo el único que me permite confirmar la presencia o ausencia del

virus. Debido a que existe una alta tasa de reactividad cruzada entre distintas familias del género *Flavivirus*, por ejemplo, el haberse puesto una vacuna contra el virus de la fiebre amarilla o haber pasado una infección por el virus de la Encefalitis de Sant Louis podría dar un resultado positivo en el test de ELISA para el VNO ya que muchos arbovirus son antigénicamente similares (Beck et al., 2013; Corrales-Aguilar, 2014; Fang y Reisen, 2006; Hernández et al., 2009; Jiménez-Clavero y Sanchez-Seco, 2014).

Las técnicas serológicas o indirectas pueden realizarse tanto en plasma como en líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de una punción lumbar y consiste en revelar la presencia de anticuerpos (Goodman., 2012; Hernández et al., 2009; Izguirre et al., 2003).

Para hacer un diagnóstico directo (aislamiento del virus, PCR, detección de antígenos virales) es muy importante tener en cuenta el tiempo del que se dispone para la toma de muestra, que debe ser en los primeros 4 días tras el comienzo de los síntomas, ya que esta debe realizarse en el periodo de tiempo en el que se pueda detectar el virus en el torrente sanguíneo, es decir, cuando la infección se encuentra en fase aguda (Hernández et al., 2009; Izguirre et al., 2003).

Tras la exposición al VNO se generan anticuerpos IgM, que pueden detectarse entre 4 y 7 días tras la picadura del mosquito y permanecer durante un año aproximadamente. Esto es debido a que los niveles de IgM necesarios para que se detecten pueden tardar en aparecer. También se producen anticuerpos IgG que no se detectan hasta 8 días después de que se manifiesten los síntomas y por lo tanto para el diagnóstico no es tan satisfactorio (Clark y Schaefer, 2020; De Filette et al., 2012).

Para confirmar la infección es necesario demostrar un aumento de 4 veces del título de anticuerpos, aislar el virus y detectar antígenos virales o genoma del virus en tejido, sangre, LCR o cualquier otro fluido corporal (Izguirre et al., 2003).

Encontrar anticuerpos como IgM en el LCR nos va a indicar infección en el sistema nervioso central ya que estos no atraviesan, de forma general, la barrera hematoencefálica (Petersen et al., 2013).

Aunque las pruebas den un resultado negativo, no se debe rechazar la posibilidad de que haya infección si no se ha realizado una prueba tras los 8 y 21 días de aparición de los síntomas y esta no haya resultado ser positiva (Osvlado y Merino, 2012).

Existe una prueba específica para la detección de VNO, el virus de la Encefalitis de San Louis y la Encefalitis Equina del Este denominado VecTest (ensayo de captura de antígeno). Tiene un formato de tira reactiva, una varilla de detección recubierta con anticuerpos específicos que

introduciendo en la solución de muestra correspondiente nos proporciona un resultado en menos de 20 minutos y además como ventaja extra no requiere un equipo complejo siendo fácil de usar (De Filette et al., 2012). Proporciona una prueba previa, rápida, segura y fácil de usar pudiendo avisar al personal de salud pública sobre la existencia del VNO en mosquitos de un área determinada. Como desventaja está la sensibilidad ya que existen otros métodos más sensibles que este, sin embargo, la precisión es prácticamente del 100% (Panella et al., 2005).

En la figura 8 podemos apreciar la comparación de resultados entre el VecTest y una PCR. Tenemos dos muestras, una positiva y otra negativa, a las cuales se les ha realizado una PCR y un VecTest paralelamente. Para aquella donde la PCR es negativa, no se obtuvo ningún resultado positivo en el VecTest. Sin embargo, en la muestra que ofreció un resultado positivo para PCR, el 89% de los casos condujo también a un resultado positivo para el VecTest, pero el 11% resultaron ser falsos negativos, de ahí que la sensibilidad de esta novedosa técnica no sea del 100%.

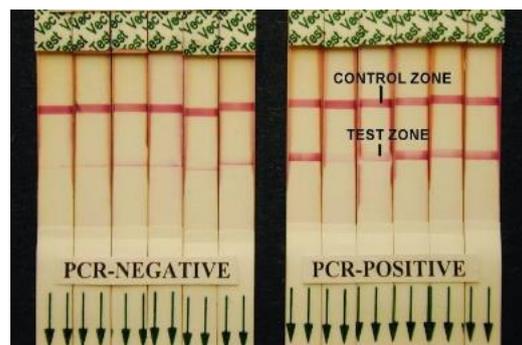


Figura 8. Comparación de resultados del VecTest con PCR (Stone et al., 2004).

Un marcador de diagnóstico al que se le está dando mucha importancia es el de la proteína NS1 que paralelamente puede ser un hit en el desarrollo de terapias y de hecho ya existen estudios de vacunas basadas en ella (Zhang et al., 2019).

Un rasgo característico de estar infectado por partículas virales del VNO es encontrar linfocitopenia en sangre periférica y un LCR con pleocitosis abundante en linfocitos, proteínas elevadas y normoglucorraquia (Izaguirre et al., 2003; Villalobos, 2015).

En la enfermedad neuronal es común la realización de ciertas pruebas como la resonancia magnética nuclear que suelen cursar sin anomalías, aunque en algunos casos es posible visualizar la presencia de edema cerebral (Villalobos, 2015).

Aunque aún quede mucho por descubrir e investigar, todo lo que hay ha servido para dar un paso al frente hacia el desarrollo de todas estas terapias y métodos de diagnóstico, siendo un

gran reto no solo para la enfermedad del VNO sino para la mayoría de los virus del género *Flavivirus* (Rastogi et al., 2016).

4.9. Última epidemia en Andalucía

Como ya hemos comentado anteriormente, España es un país que se encuentra en una zona estratégica para el paso de aves migratorias entre África y Europa en la cual el VNO es endémico, además la alta presencia de zonas húmedas como los deltas de los ríos, pantanosas o lagos, en las cuales encontramos aves migratorias y mosquitos que va a favorecer más aun la propagación del virus. Por otro lado, teniendo en cuenta que las condiciones climáticas son muy favorables y existen vectores que están en contacto con aves y humanos, es muy fácil el mantenimiento y circulación del virus responsable de la FNO. Debido a todo esto España tiene un alto índice de riesgo de que puedan aparecer brotes constantemente (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021).

El VNO lleva expandiéndose geográficamente desde 2010 en Europa con marcada estacionalidad. El primer brote ocurrido en España tuvo lugar en Extremadura en la provincia de Badajoz durante el año 2004 con un caso confirmado, posteriormente otros dos casos fueron diagnosticados en 2010 y en el año 2016 en Andalucía, con tres casos positivos. Paralelamente se diagnosticó también un aumento de brotes en équidos. No obstante, la primera vez que se registró la presencia del VNO en España fue en la década de 1980, encontrándose en el suero de la población de Cataluña de un estudio retrospectivo (García San Miguel et al., 2021; López-Ruiz et al., 2018).

Desde agosto de 2020, se identifican varios casos de meningoencefalitis linfocitaria humana en la provincia de Sevilla, Andalucía, produciendo en total 5 muertes, todos residentes de Puebla del Río y Coria del Río, pueblos ubicados en las marismas del Guadalquivir y cercanos a arrozales. La enfermedad afectó a todas las edades, existiendo casos entre 4 y 88 años. Esto vino precedido por la observación de una densidad de mosquitos de la especie *Culex perexiguus* anormal, bastante más alto que otros años, que fueron capturados en distintas poblaciones de Sevilla y Huelva. Tras el análisis de estos mosquitos se observó que el VNO estaba muy presente en todos ellos (Ministerio de Sanidad, 2020). Sin embargo, Jordi Figuerola, investigador principal del CSIC en la Estación Biológica de Doñana, explica que el mosquito transmisor del VNO que generó este brote en España fue principalmente por *Culex perexiguu*, que es incapaz de desplazarse más de un kilómetro y que por lo tanto nacieron cerca de donde se infectaron los afectados y no provenían de Doñana (Perdiguero, 2021).

La alta actividad del vector en esta temporada 2020 y en estas áreas puede relacionarse con variables climáticas sucedidas en ese entonces, en el que tuvo lugar una primavera con lluvias abundantes e intensas en el mes de mayo en comparación con lo habitual otros años (García San Miguel et al., 2021).

Al tratarse de una situación sin precedente, desde el primer caso sospechado y posteriormente confirmado, se informó a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y al Centro Coordinador de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES) tras lo que se implementaron medidas de control en sus territorios (García San Miguel et al., 2021).

En Andalucía el plan de vigilancia comienza cada abril cuando el mosquito empieza a tener mayor actividad pudiendo terminar en enero del siguiente año según los datos entomológicos que se obtengan cada periodo anual (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021). También desde 2007 se pone en marcha un plan nacional de vigilancia del VNO en caballos y aves.

Este último brote coincide con la situación pandémica en la que se encontraba no solo España si no el mundo entero, en la que probablemente los recursos se hayan dedicado, en su mayor parte, a medidas de higiene del control de la COVID-19, descuidando los tratamientos de control del mosquito y prevención de la enfermedad del VNO.

Toda esta situación sirvió para mejorar la capacidad de detección de nuevos casos humanos y por tanto prepararnos mejor para las siguientes temporadas (García San Miguel et al., 2021). Gracias a esos protocolos establecidos ha sido detectado un nuevo caso reciente en junio de 2021, ya que desde entonces se debe realizar la prueba de detección del VNO a todas las meningoencefalitis de origen desconocido.

Por lo tanto, tras los casos ocurridos en 2020, diez meses más tarde se informa de un nuevo caso de meningoencefalitis por Virus del Nilo Occidental en Sevilla al Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía por parte de la Dirección General de Salud Pública y Ordenación Farmacéutica. El paciente se encuentra ingresado en la UCI infectado al mismo tiempo por COVID. Inmediatamente se han puesto en marcha todos los protocolos y medidas de salud pública necesarias y hasta la fecha no se ha detectado circulación viral en caballos o aves, existiendo aun bajas poblaciones de mosquitos adultos. Debido a que el primer caso de esta temporada ha sido evidenciado con más antelación de lo habitual, se siguen realizando pruebas para descartar un falso positivo y se considera como algo excepcional (Laínez, 2021; Saiz, 2021).

5. CONCLUSIONES

Tras la realización de este Trabajo Fin de Grado podemos elaborar las siguientes conclusiones:

1. El virus del Nilo Occidental, de geometría icosaédrica, está formado por un material genético de ARN monocatenario de sentido positivo, 3 proteínas estructurales (entre ellas la proteína E que se unirá al receptor para penetrar en la célula) y siete no estructurales (siendo la NS1 la de mayor importancia y una posible diana terapéutica y profiláctica). Se han descrito dos linajes principales, el Linaje 1 y 2.
2. Es un virus neurotrópico, transmitido por mosquitos del género *Culex*, que afectará al sistema nervioso central en 1% de los casos manifestándose como una encefalitis, tras un ciclo de transmisión ave-mosquito-ave en el que cual los seres humanos de forma accidental podemos formar parte, pero sin contribuir a su transmisión.
3. El VNO ha ido extendiéndose y propagándose durante más de 80 años, produciendo brotes en todos los continentes, siendo el arbovirus más repartido en toda La Tierra.
4. No se ha encontrado ningún tratamiento específico para el VNO realmente efectivo, este se basa esencialmente en paliar los signos y síntomas que la enfermedad ocasiona, aunque hay varios fármacos que se han utilizado o se encuentran en alguna de las fases de desarrollo.
5. Destacar la importancia en la prevención y el control tanto del mosquito como de los animales transmisores de la enfermedad ya que no está desarrollada vacuna para la prevención del VNO para humanos actualmente, aunque sí para caballos.
6. En España, el último brote importante ocurrió en el verano de 2020, en la cuenca del Guadalquivir y ya este año se ha detectado un nuevo caso.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdullai I, Dangana A, Abdurrahman A, Ojeamiren I, Uchenna A. Human reemerging arboviral diseases of the late 21st century: from ecological-epidemiology to control strategies. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*. Nigeria: Elsevier; 2020. p. 9-23.
2. Alejo-Cancho I, Martínez MJ, Velasco M, SEMTSI. Arbovirosis emergentes y reemergentes: dengue, chikungunya, Zika y fiebre del Nilo Occidental. Revisión de su distribución geográfica, mecanismos de transmisión y diagnóstico. *Rev. Enf. Emerg.* 2020; 19(1): 19-32.
3. Alsaleh K, Khou C, Frenkiel MP, Lecollinet S, Vázquez A, Rmírez de Arellano E, Després P, Parigon N. The E glycoprotein plays an essential role in the high pathogenicity of European–Mediterranean IS98 strain of West Nile virus. *Virology*. 2016; 492: 53-65.
4. Andrade C, Arrigo N, Beaty B, Bolling B, Brault A, Calisher C, et al. *Arboviruses Molecular Biology Evolution and Control*. Norfolk: Caister Academic Press; 2016.
5. Araujo SC, Pereira LR, Alvez R, Andreara-Santos R, Kanno AI, Ferreira LC, et al. Anti-Flavivirus vaccines: review of the present situation and perspectives of subunit vaccines produced in *Escherichia coli*. *Vaccines*. 2020; 8(3): 492.
6. Ashhurst TM, Vreden Cv, Munoz-Erazo L, Niewold P, Watabe K, Terry RL, et al. Respuestas antivirales de macrófagos en encefalitis por flavivirus. *Indian J. Med. Res.* 2013; 138(5): 632-647.
7. Barzon L. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J. Clin. Virol.* 2018; 107: 38-47.
8. Beck C, Jiménez-Clavero MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Lepare.Goffart I, et al. Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2013; 10 (11): 6049-6083.
9. Bernabeu-Wittel M, Ruiz-Pérez M, del Toro MD, Aznar J, Muniain A, de Ory F, et al. West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2007; 25(9):561-565.
10. Bologheanu R, Lorez S, Thurnher M, Schiefer J, Santoja I, Holzmann H, et al. Unexpected complete recovery of a patient with severe tick-borne encephalitis treated with favipiravir. *Antiviral. Res.* 2020; 184.
11. Brinton MA. Replication cycle and molecular biology of the West Nile Virus. *Viruses*. 2013; 6(1):13-53.

12. Burkett-Cadena N. Mosquitoes of the Southeastern United States. Alabama; University of Alabama Press: 2013.
13. Carrada T. Encefalitis por virus Nilo-Oeste: Epidemiología, ecología, diagnóstico y prevención. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 2004; 51(1): 6-15.
14. Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile Virus. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015.
15. Cho H, Diamond M. Immune responses to West Nile Virus infection in the central nervous system. *Viruses.* 2012; 4(12): 3812-3830.
16. Ciota AT, Keyel AC. The role of temperature in transmission of zoonotic arboviruses. *Viruses.* 2019; 11(11): 1013.
17. Clark MB, Schaefer TJ. Virus del Nilo Occidental. *StatPearls.* 2020.
18. Corrales-Aguilar E. Historical review, virology and ecology of West Nile virus: technical recommendations. *Rev. Costarr. Salud Pública.* 2014; 23(2): 143-153.
19. Cortes A. El mosquito que está detrás del brote infeccioso de Sevilla [Internet]. *El País.* 2020 [en línea]. [Consultado abril 2021]. Disponible en: <https://elpais.com/ciencia/2020-08-13/el-mosquito-que-esta-detras-del-brote-infeccioso-de-sevilla.html>
20. De Filette M, Ulbert S, Diamond M, Sanders N. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet. Res.* 2012; 43(1): 16.
21. Donadieu E, Bahuon C, Lowenski S, Zientara S, Couplier M, Lecollinet S. Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses. *Viruses.* 2013; 5(11): 2856-2880.
22. Esser HJ, Mögling R, Cleton NB, van der Jeugd H, Sprong H, Stroo A, et al. Risk factors associated with sustained circulation of six zoonotic arboviruses: a systematic review for selection of surveillance sites in non-endemic areas. *Parasit. Vectors.* 2019; 12(1): 265.
23. Eyer L, Zouharová D, Sirmarová J, Fojtíková M, Stefánik M, Haviernik J, et al. Antiviral activity of the adenosine analogue BCX4430 against West Nile virus and tick-borne Flaviviruses. *Antiviral. Res.* 2017; 142: 63-67.
24. Fang Y, Reisen WK. Previous infection with West Nile or St. Louis encephalitis viruses provides cross protection during reinfection in house finches. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75(3): 480-485.
25. Forrester NL, Coffey LL, Weaver SC. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses.* 2014; 6(10): 3991-4004.
26. García San Miguel L, Fernández-Martínez B, Sierra MJ, Vázquez A, Julián P, Garcia E, et al. Unprecedented increase of West Nile virus neuroinvasive disease, Spain, summer 2020. *Euro. Surveill.* 2021; 26(19).

27. Goodman D. Virus del Nilo Occidental. JAMA. 2012; 308(10).
28. Gould LH, Fikrig E. Virus del Nilo Occidental: ¿una preocupación creciente? J. Clin. Invest. 2004; 113(8): 1102-1107.
29. Guzmán C, Calderón A, Mattar S, Tadeu-Figuereido L, Salazar-Bravo J, Alvis-Guzmán N, Zakzuk E, González M. Ecoepidemiology of Iphaviruses and Flaviviruses. Emerging and Reemerging Viral Pathogens. Colombia: Elsevier; 2020. p. 101-125.
30. Hammami S, Ben T. Emergent mosquito-borne Flaviviruses and animal diseases. Emerging and Reemerging Viral Pathogens. Tunisia: Elsevier; 2020. p. 815-846.
31. Hasan SS, Sevvana M, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural biology of Zika virus and other Flaviviruses. Nat. Struct. Mol. Biol. 2018; 25(1): 13-20.
32. Haviernik J, Stefánik M, Fojítvoká M, Kali S, Tordo N, Rudolf I, et al. Arbidol (Umifenovir): A broad-spectrum antiviral drug that inhibits medically important arthropod-borne Flaviviruses. Viruses. 2018; 10(4): 184.
33. Hernández RI, Bravo LL, Morón DM, Armas E, Girón BJ, Aponte CD. West Nile Virus: Review. INHRR. 2009; 40(1).
34. Holbrook MR. Historical perspectives on Flavivirus research. Viruses. 2017; 9(5): 97.
35. Instituto de Salud Global de Barcelona. Arbovirus [Internet]. ArboCat. [Consultado en abril de 2021]. Disponible en: <http://arbocat.cat/es/sobre-los-arbovirus/>
36. Izaguirre R, López LE, Richard JA, Mesa JA, Herrera O. Infección por virus del Nilo Occidental. Rev. Esp. Med-Quir. 2003; 8(2): 5-7.
37. Jang H, Boltz DA, Webster RG, Smeyne RJ. Viral parkinsonism. Biochim. Biophys. Acta. 2009; 1792(7): 714-721.
38. Jiménez-Clavero MA, Sánchez-Seco MP. El virus del Nilo occidental (virus West Nile): epidemiología, prevención y control. Zoonosis. 2014; 15(60): 64-69.
39. Kanai R, Kar K, Anthony K, Gould LH, Ledizet M, Fikrig E, et al. Crystal structure of West Nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. J. Virol. 2006; 80(2): 11000-11008.
40. Laínez M. ABCdesevilla. Un paciente con Covid, primer caso de Virus del Nilo de este verano en Sevilla. 2021.
41. Lim SM, Koraka P, Osterhaus AD, Martina BE. West Nile Virus: Immunity and pathogenesis. Viruses. 2011; 3(6): 811-828.
42. Linëiro E, Fernández FJ. Manual Práctico de Virología. Cádiz; UCA: 2016.
43. Loeb M. Genetic susceptibility to West Nile virus and dengue. Public. Health. Genomics. 2013; 16(1-2): 4-8.

44. López-Ruiz N, Montaña-Remacha MC, Durán-Pla E, Pérez-Ruiz M, Navarro-Marí JM, Salamanca-Rivera C, et al. Brote de virus del Nilo Occidental en humanos y vigilancia epidemiológica, Andalucía Occidental, España, 2016. *Euro. Surveill.* 2018; 23(14).
45. López-Vélez R, Molina Moreno R. Cambio climático en España y riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias transmitidas por artrópodos y roedores. *Rev. Esp. Salud Pública.* 2005; 79(2): 177-190.
46. Martín-Acebes MA, Vázquez-Calvo Á, Saiz JC. Lipids and Flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses. *Prog. Lipid. Res.* 2016; 64: 123-137.
47. Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell. Host. Microbe.* 2012; 12(4): 544-557.
48. Merle H, Donnio A, Jean-Charles A, Guyomarch J, Hage R, Najjioullah F, et al. Ocular manifestations of emerging arboviruses: Dengue fever, Chikungunya, Zika virus, West Nile virus, and yellow fever. *J. Fr. Ophtalmol.* 2018; 41(6):235-243.
49. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Actualización de la situación epidemiológica de la fiebre del Nilo Occidental (West Nile fever) [Internet]. 2021 [en línea]. [Consultado en abril 2021]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informefno_2021-01-29_tcm30-435293.pdf
50. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Programa de vigilancia fiebre del Nilo Occidental [Internet]. 2021 [en línea]. [Consultado en abril 2021]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programafiebredelnilooccidental2021_tcm30-437515.pdf
51. Ministerio de Sanidad. Meningoencefalitis por el virus del Nilo occidental en España [en línea]. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2020. [Consultado en marzo 2021]. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/docs/20201203_ERR_Nilo_Occidental.pdf
52. Mustapha M. General Introduction to Volume 1 Emergent and reemergent viruses: Modern important issues. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens.* Morocco: Elsevier; 2020. p. 1-7.
53. Okamoto T, Suzuki T, Kusakabe S, Tokunaga M, Hirano J, Miyata Y, et al. Regulation of apoptosis during Flavivirus infection. *Viruses.* 2017; 9(9): 243.

54. Osvaldo DJ, Merino DE. Fiebre por virus del Nilo Occidental. ¿Otra patología emergente relacionada con el cambio climático? *Rev. Asoc. Méd. Argent.* 2012; 125(4): 9-40.
55. Panella NA, Burkhalter KL, Langevin SA, Brault AC, Schooley LM, Biggerstaff BJ. Rapid West Nile virus antigen detection. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(10): 1633-1635.
56. Papa A. Emerging arboviruses of medical importance in the Mediterranean region. *J. Clin. Virol.* 2019; 115: 5-10.
57. Parkash V, Woods K, Kafetzopoulou L, Osborne J, Aarons E, Cartwright K. West Nile virus infection in travellers returning to United Kingdom from South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(2): 367-369.
58. Perdiguero T. La avanzadilla científica frente al virus del Nilo. *Diario de Sevilla.* 2021
59. Pérez-Ramírez E, Llorente F, del Amo J, Fall G, Alpha A, Lubisi A, et al. Pathogenicity evaluation of twelve West Nile virus strains belonging to four lineages from five continents in a mouse model: discrimination between three pathogenicity categories. *J. Gen. Virol.* 2017; 98: 662-670.
60. Pesko KN, Ebel GD. Genética y evolución de la población del virus del Nilo Occidental. *Infect. Genet. Evol.* 2012; 12(2): 181-190.
61. Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. West Nile Virus: Review of the Literature. *JAMA.* 2013; 310(3): 308-315.
62. Puerta-Guardo H, Glasner DR, Espinosa DA, Biering SB, Patana M, Ratnasiri K, et al. Flavivirus NS1 triggers tissue-specific vascular endothelial dysfunction reflecting disease tropism. *Cell. Reo.* 2019; 26(6): 1598-1613.
63. Pulido S. ¿Cuál es la diferencia entre brote, epidemia y pandemia? [Internet]. *Gaceta Médica*: 12 de marzo de 2012 [en línea]. [Consultado en abril 2021]. Disponible en: <https://gacetamedica.com/investigacion/cual-es-la-diferencia-entre-brote-epidemia-y-pandemia/>
64. Quicke KM, Suthar MS. The innate immune playbook for restricting West Nile virus infection. *Viruses.* 2013; 5(11): 2643-2658.
65. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol. J.* 2016; 13(131): 1-10.
66. Real Decreto 526/2014, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación. *Boletín oficial del estado*, 167, de 10 de julio de 2014, 54170-54178. Recuperado de: <https://www.boe.es/boe/dias/2014/07/10/pdfs/BOE-A-2014-7291.pdf>

67. Rizzoli U, Jiménez-Clavero MA, Barzon L, Cordioli P, Figuerola J, Koraka P, et al. El desafío del virus del Nilo Occidental en Europa: lagunas de conocimiento y prioridades de investigación. *RNVE*. 2020; 15(24).
68. Roiz D, Roussel M, Muñoz J, Ruiz S, Soriguer R, Figuerola J. Efficacy of mosquito traps for collecting potential West Nile mosquito vectors in a natural Mediterranean wetland. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012; 86(4): 642-648.
69. Saiz E. Detectado en Sevilla el primer caso de un paciente infectado con Covid y virus del Nilo Occidental. *El País*. 2021.
70. Saiz JC. Animal and human vaccines against West Nile virus. *Pathogens*. 2020; 9(12): 1073.
71. Samuel GH, Adelman ZN, Ashhurst KM. Antiviral immunity and virus-mediated antagonism in disease vector mosquitoes. *Trends. Microbiol.* 2018; 26(5): 447-461.
72. Sinigaglia A, Pacenti M, Martello T, Pagni S, Franchin E, Barzon L. West Nile virus infection in individuals with preexisting Usutu virus immunity, northern Italy, 2018. *Euro. Surveill.* 2019; 24(21).
73. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*. 2011; 3(2): 160-171.
74. Stefanik M, Valdes JJ, Ezebuo FC, Haviernik J, Uzochukwu IC, Fojtikova M, et al. FDA-Approved drugs Efavirenz, Tipranavir, and Dasabuvir inhibit replication of multiple Flaviviruses in Vero Cells. *Microorganisms*. 2020; 8(8): 599.
75. Stone WB, Okoniewski JC, Therrien JE, Kramer LD, Kauffman EB, Eidson Millicent. VecTest as diagnostic and surveillance tool for West Nile virus in dead birds. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(12): 2175-2181.
76. Ulbert S. West Nile virus vaccines – current situation and future directions. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019; 15(10): 2337-2342.
77. Una científica española advierte: "Es casi seguro que el virus del Nilo esté en más zonas de España" [Internet]. 20minutos: 26 de septiembre de 2020. [Consultado en abril 2021]. Disponible en: <https://www.20minutos.es/noticia/4395581/0/cientifica-espanola-advierte-seguro-virus-nilo-zonas-espana/>
78. Valdez F, Salvador J, Palermo PM, Mohl JE, Hanley KA, Watts D, Llano M. Schlafen 11 restricts Flavivirus replication. *Viol. J.* 2019; 93(15).
79. Valero N. West Nile virus: A new challenge? *Invest. Clin.* 2003; 44(3).
80. Vargas M. *Virología Médica*. Colombia; El Manual Moderno: 2016.

81. Vázquez A, Ruiz S, Herrero L, Moreno J, Molero F, Magallanes A, et al. West Nile and Usutu Viruses in mosquitoes in Spain, 2008–2009. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 85(1): 178-181.
82. Vigerust DJ, Shepherd V. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends. Microbiol.* 2007; 15(5): 211-218.
83. Villalobos MA. Clinical features of West Nile virus infection in humans. *Rev. Costarr. Salud Pública.* 2015; 24(2).
84. Vonesch N, Binazzi A, Bonafede M, Melis P, Ruggieri A, Iavicoli S, Tomao P. Emerging zoonotic viral infections of occupational health importance. *Pathog. Dis.* 2019; 77(2).
85. Wiwanitkit V. Focus on arbovirus infections. New York: Nova Science Publishers; 2009.
86. Zhang Y, Gao W, Li J, Wu W, Jiu Y. The role of host cytoskeleton in Flavivirus infection. *Viol. Sin.* 2019; 34(1): 30-41.