



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

La fiebre/encefalitis por virus West Nile: reemergencia en Europa y situación en España

Elena Sotelo, Jovita Fernández-Pinero y Miguel Ángel Jiménez-Clavero*

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Valdeolmos, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 3 de junio de 2011

Aceptado el 6 de septiembre de 2011

On-line el 9 de noviembre de 2011

Palabras clave:

West Nile

España

Europa

Enfermedad emergente

R E S U M E N

En los últimos años se ha producido un incremento en la incidencia y rango geográfico de algunas arbovirosis, de las cuales quizá la más destacable sea la fiebre/encefalitis por virus West Nile. Esta enfermedad no recibió demasiada atención hasta los graves brotes ocurridos entre 1996 y 1999 en Rumanía, Rusia e Israel. Pero el acontecimiento que provocó una atención sin precedentes fue su aparición en Nueva York en 1999. Desde entonces su incidencia no ha dejado de crecer, y su rango geográfico de ampliarse. En América se ha extendido de costa a costa y desde Canadá hasta Argentina. En Europa ha aumentado su incidencia allí donde ya había ocurrido, y, recientemente, afectado zonas donde nunca antes había sido observada. El presente artículo es una revisión sobre el virus, la enfermedad, y su situación en Europa, con especial referencia a España, donde en 2010 se produjeron casos clínicos humanos y veterinarios.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

West Nile fever/encephalitis: re-emergence in Europe and the situation in Spain

A B S T R A C T

Some arbovirosis have increased their incidence and geographic range in the past few years. This phenomenon has been particularly noticeable in the case of West Nile fever/encephalitis. This disease did not receive much attention until serious outbreaks occurred in Romania, Russia and Israel between 1996 and 1999. But the event drawing an unprecedented attention to this disease was its occurrence in New York in 1999. Since then its incidence and geographic range has not ceased to grow. In America it has extended from coast to coast and from Canada to Argentina. In Europe, the disease incidence has increased in areas where it had already been reported, and, recently, affected other areas where it had never been observed before. The present article is a review on the virus, the disease, and its situation in Europe, with special reference to Spain, where in 2010 human and veterinary cases were reported.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

West Nile

Spain

Europe

Emerging disease

Descripción general y clasificación del virus West Nile

El virus West Nile (WNV) es un arbovirus zoonótico emergente extendido ampliamente en el mundo y de impacto considerable en sanidad animal y en salud pública¹. Transmitido fundamentalmente por picadura de mosquitos, su reservorio natural lo constituye un amplio rango de especies de aves silvestres, que con sus migraciones contribuyen a dispersar el virus fuera de sus zonas endémicas. Asimismo, el virus puede resultar patógeno en humanos y equinos. La fiebre/encefalitis causada por este virus puede tener graves repercusiones sanitarias, y el hecho de que puede propagarse internacionalmente con rapidez hace que sea una de las

enfermedades incluidas en el Reglamento Sanitario Internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS, www.who.int), así como en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, www.oie.int). En la actualidad el WNV es el arbovirus más extendido en el mundo, y en las últimas décadas ha cobrado una mayor importancia debido a su sorprendente capacidad de invadir nuevas zonas geográficas causando en numerosas ocasiones brotes epidémicos de gran virulencia.

Estructura y organización genómica del WNV

El WNV pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, y dentro de éste se engloba en el serocomplejo de la encefalitis japonesa junto con otros virus encefalíticos como el de la encefalitis de Saint Louis (SLEV), encefalitis del valle de Murray (MVEV)

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: majimenez@inia.es (M.Á. Jiménez-Clavero).

y encefalitis japonesa (JEV)². Su genoma comprende una única molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de unos 11.000 nucleótidos que codifica una poliproteína que es procesada proteolíticamente para dar lugar a las 10 proteínas víricas maduras. De ellas, tres son estructurales (cápsida, C; premembrana/membrana, prM/M y envoltura, E) y están implicadas en la interacción con la superficie de la célula hospedadora y en la formación de la cápsida y la envoltura vírica. Las otras siete proteínas son no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) y se consideran multifuncionales, actuando de forma directa o indirecta en la replicación vírica³. Los extremos 3' y 5' no codificantes (NTR) son regiones con estructuras secundarias muy conservadas y de importancia en la replicación vírica.

Ciclo de replicación vírica

Todavía se desconoce cuáles son los receptores celulares del WNV, aunque hay datos acerca de la implicación de la clatrina en el mecanismo de endocitosis del virus⁴ y de los microdominios ricos en colesterol o «lipid rafts» (balsas lipídicas) en el proceso de infección⁵. La entrada de los viriones en la célula va seguida de un descenso de pH que propicia la fusión de la membrana vírica con la membrana de la vesícula endosómica, produciéndose la liberación de la nucleocápsida vírica en el citoplasma de la célula⁶. El genoma de ARN se libera y se traduce en una única poliproteína que posteriormente origina las proteínas víricas maduras. El ensamblaje y la encapsidación del virión ocurren en asociación con las membranas del retículo endoplasmático rugoso, y los viriones inmaduros intracelulares se acumulan en vesículas para posteriormente ser modificados y liberados por exocitosis como viriones maduros^{7,8}.

Historia y distribución de brotes epidémicos

El WNV se aisló por primera vez a partir de sangre de una mujer febril en el distrito de West Nile, en Uganda en 1937⁹ y posteriormente de mosquitos, aves y humanos en Egipto a principios de los años cincuenta^{10,11}, estableciéndose así su ciclo epidemiológico básico (ave-mosquito). En esa misma década de 1950 ocurrieron en Israel los primeros brotes de enfermedad grave en humanos¹².

En Europa el primer brote epidémico documentado tuvo lugar en la Camarga francesa en los años 1962 a 1965, afectando a caballos y a humanos^{13,14}. En el Alentejo portugués se detectó un brote de encefalitis en caballos en 1968, que se atribuyó (por pruebas serológicas efectuadas *a posteriori*) a infección por WNV¹⁵. Sin embargo, es a partir de los años noventa cuando aumenta tanto el número de brotes como la virulencia de los mismos. De entre ellos los ocurridos en Bucarest (Rumanía) en 1996–1997¹⁶ y en Volgogrado, al sur de Rusia, en 1999¹⁷, se consideran los mayores brotes causados por arbovirus registrados hasta la fecha en Europa, con centenares de casos de enfermedad neurológica grave y decenas de muertes en ambos. Destacan también los brotes ocurridos en Israel entre 1997 y 2000, de incidencia similar^{18–22}. A finales de los años noventa se detectaron brotes en caballos en Italia²³ y Francia²⁴. En este último país siguieron produciéndose casos esporádicos, tanto en caballos como en humanos, en los años siguientes²⁵. La *tabla 1* muestra un resumen cronológico de los brotes por WNV registrados en Europa y la cuenca mediterránea.

Entre agosto y septiembre de 1999, el WNV alcanzó el Nuevo Mundo, hipotéticamente fruto de una introducción única desde Israel en el área de la ciudad de Nueva York^{26,27}, donde causó un brote epidémico que afectó a humanos, caballos y aves²⁸. Pese a las bajas temperaturas, el virus sobrevivió al invierno para resurgir al año siguiente²⁹. Mientras que en los años 2000 y 2001 la expansión del WNV en EE. UU. fue más o menos contenida, en

Tabla 1

Brotes de fiebre/encefalitis por virus West Nile en Europa y la cuenca mediterránea, ordenados cronológicamente, desde 1951 a la actualidad

Año(s)	País	Carácter	Especie(s) afectada(s)	Referencias
1951	Egipto	Esporádico	Humanos, aves	10, 11
1951–52	Israel	Epidémico	Humanos	12
1962–65	Francia	Epidémico	Caballos, humanos	13, 14
1968	Portugal	Epidémico	Caballos	15
1963–65	Rusia	Epidémico	Humanos	89
1985	Ucrania	Epidémico	Humanos	89
1994	Argelia	Epidémico	Humanos	14
1996	Rumania	Epidémico	Humanos	16
1996	Marruecos	Epidémico	Caballos	53
1997	Túnez	Epidémico	Humanos	14
1998	Italia	Epidémico	Caballos	20
1997–2001	Israel	Epidémico	Humanos, caballos, aves	19
1998	Georgia		Humanos	89
1999	Rusia	Epidémico	Humanos	17, 85
2000	Francia	Epidémico	Caballos	21
2003	Francia	Esporádico	Caballos, humanos	22
2003	Túnez	Epidémico	Humanos	58
2004	Portugal	Esporádico	Humanos	78
2004	España	Esporádico	Humanos	76
2004	Francia	Esporádico	Aves, caballos	40
2004	Israel	Esporádico	Humanos	45
2004	Hungría	Esporádico	Aves	42
2006	Francia	Esporádico	Caballos	41
2007	España	Esporádico	Aves	61
2008	Austria	Esporádico	Aves	59
2008–10	Italia	Epidémico	Caballos, humanos, aves	47–51
2010	Grecia	Epidémico	Humanos, Aves	63, 83
2010	Marruecos	Epidémico	Caballos	52
2010	España	Epidémico	Caballos, humanos	62
2010	Rusia	Epidémico	Humanos	56–57
2010	Bulgaria	Epidémico	Caballos	60
2010	Rumanía	Esporádico	Humanos	55
2010	Hungría	Esporádico	Humanos	44
2010	Israel	Esporádico	Humanos	46

2002 el número de casos en aves, caballos y humanos aumentó dramáticamente para, a finales de 2004, estar presente en todos los estados continentales³⁰. Desde su introducción en 1999 hasta 2010, se han registrado en este país más de 30.000 casos clínicos y alrededor de 1.200 muertes en humanos, más de 25.000 casos equinos y millares de muertes en aves³¹.

El rango geográfico del WNV en el continente americano sigue aumentando y, además de en EE. UU., se ha detectado su actividad en otros países. En Canadá, el WNV fue aislado por primera vez en aves en 2001, mientras que la expansión hacia el sur fue advertida por vez primera en las Islas Caimán en ese mismo año³², detectándose circulación vírica posteriormente en Jamaica³³, República Dominicana³⁴, Cuba³⁵, Puerto Rico³⁶, Guadalupe³⁷, México^{38,39}, Argentina⁴⁰, Venezuela⁴¹ y Colombia⁴².

Con respecto a WNV en Europa y la cuenca mediterránea, desde 2000 ha ocurrido un recrudecimiento de la situación, aumentando la actividad de la enfermedad en aquellos lugares en donde ya había sido observada, como Francia^{25,43,44}, Hungría^{45–47}, Israel^{48,49}, Italia^{50–54}, Marruecos^{55,56}, Portugal⁵⁷, Rumanía⁵⁸, Rusia^{59,60} y Túnez⁶¹, y apareciendo en nuevos territorios, como Austria⁶², Bulgaria⁶³, España^{64,65} y Grecia⁶⁶ (*tabla 1*). En 2010 en particular ha tenido lugar un significativo aumento de casos humanos en Europa (342 casos clínicos, 41 muertes), en Grecia, Hungría, Rumanía, Italia y España. El brote en Grecia fue el peor que ha ocurrido en la Unión Europea hasta hoy, con 35 fallecidos. Las otras muertes por la enfermedad se produjeron en Rumanía y Hungría (5 y 1 casos mortales, respectivamente). Es destacable también que

en esta década se detectan por primera vez en Europa, en concreto en Francia, Italia, España, Hungría y Austria, casos esporádicos de patogenicidad en aves^{43,45,62,64,67}.

La fiebre/encefalitis por WNV en España

Los primeros estudios que describen la presencia de anticuerpos hemaglutinantes frente al WNV en humanos y animales en nuestro país datan de los años setenta⁶⁸⁻⁷⁰, pero es a partir del año 2000 cuando se registran los datos más significativos acerca de la circulación de este virus en España. Por un lado, un estudio en humanos reveló una baja seroprevalencia (0,6%) de anticuerpos frente a la enfermedad en el sur de España⁷¹. Por otro, en estudios seroepidemiológicos realizados en el entorno del Parque Nacional de Doñana se reveló una seroprevalencia global del 10,4% en aves de distintas especies en 2004⁷², siendo ésta mayor en aves migratorias que en residentes, y, dentro de las primeras, más elevada en las subsaharianas⁷³. Además, en una especie en particular, la focha común (*Fulica atra*), se halló un 40% de seroprevalencia y en varios individuos se pudo demostrar seroconversión, lo que confirmaba por primera vez la circulación de WNV en España⁷⁴.

Paralelamente, entre 2001 y 2005 en Castilla La Mancha se detectaron anticuerpos específicos para el WNV, así como muestras RT-PCR positivas al mismo virus en águilas imperiales en cautividad y en libertad⁷⁵. Dos años después (septiembre de 2007) se consiguió aislar por primera vez el WNV en España a partir de dos águilas reales, una sana y otra enferma que presentaba signos neurológicos⁶⁴.

En lo que respecta a caballos, en 2005 se detectaron anticuerpos neutralizantes frente a WNV en distintas regiones del Parque Nacional de Doñana, mostrando valores de seroprevalencia cercanos al 8% pero sin registrarse casos clínicos⁷⁶. Las tasas de anticuerpos positivos en équidos descendieron en los años subsiguientes⁷⁷ y no volvió a haber evidencia de circulación de WNV en esta especie en España hasta septiembre de 2010, cuando en el sur de Cádiz, no lejos de la zona de Doñana donde se han hecho la mayor parte de los estudios serológicos citados, tuvo lugar una epizootia de WNV con 31 brotes que afectaron a 44 caballos, de los cuales 9 sucumbieron a la enfermedad, constituyendo éste el primer brote de enfermedad por WNV en caballos en España⁶⁵.

En humanos hasta ahora se han documentado únicamente tres casos clínicos en nuestro país, todos ellos con signos de meningitis. El primero, en 2004, fue un varón de 21 años residente en Cataluña y que había pasado el verano en Valverde de Leganés (Badajoz) donde presuntamente pudo adquirir la infección^{78,79}. Cabe señalar que en 2004 hubo dos casos humanos de enfermedad por WNV en turistas irlandeses que visitaron zonas del Algarve con interés ornitológico⁸⁰. En esas mismas zonas se detectó poco después actividad del virus en mosquitos⁸¹. Los otros dos casos clínicos tuvieron lugar en Chiclana de la Frontera y en Benalup-Casas Viejas (Cádiz) en septiembre de 2010, coincidiendo con los primeros casos de enfermedad por WNV en caballos citados anteriormente⁸².

Genotipos y epidemiología molecular del WNV

Los análisis filogenéticos basados en la secuencia nucleotídica del genoma completo de aislados del WNV permiten su clasificación en al menos 5 linajes diferenciados, mostrando entre ellos una divergencia genética de entre un 20 y un 25%⁸³. Su división filogenética no correlaciona con su distribución geográfica, lo que pone de relevancia la importancia de las migraciones aviares en la dispersión del virus⁸⁴.

El linaje 1 presenta distribución mundial, pudiendo afectar a humanos, caballos y aves. Dentro de este linaje se pueden distinguir dos clados: el 1a, que comprende aislados de Europa,

África, América e Israel, y el 1b, representado por el subtipo australiano Kunjin⁸⁵. El linaje 2 se consideraba restringido a África Subsahariana y Madagascar, hasta que a partir de 2004 se ha venido detectando en varios países del centro y este de Europa (Austria, Hungría, Rusia, Grecia y Rumanía) afectando a aves, caballos y humanos^{58,59,86}. El linaje 3 o virus Rabensburg comprende dos representantes obtenidos de mosquitos *Culex pipiens* en la República Checa en 1997 y 1999⁸⁷ y el linaje 4 engloba varios aislados, el primero detectado en 1988 en el Cáucaso (Krasnodar) a partir de la garrapata *Dermacentor marginatus*⁸⁸. Hasta la fecha no hay descrito ningún caso de enfermedad asociado a los linajes 3 y 4, y se desconoce si son capaces de afectar al ser humano. Por último, el linaje 5 está constituido por aislados de la India de los años 1955-1982 de procedencia diversa, incluyendo aislamientos a partir de mosquitos, murciélagos y humanos⁸³. Recientemente (2006) se ha detectado en España en un pool de mosquitos tomado en las Marismas del Odiel (Huelva) un virus que genéticamente parece corresponder a un sexto linaje de WNV⁸⁹. Los análisis filogenéticos ofrecen resultados relevantes para conocer la dinámica y dispersión geográfica de estos virus. La reciente introducción y posterior establecimiento de circulación endémica y dispersión geográfica en Europa de virus de linaje 2 es un claro ejemplo de esta dinámica^{46,86}. En estudios recientes se muestra como todos los WNV detectados en países del entorno Mediterráneo Occidental desde 1996 están estrechamente relacionados, lo que parece sugerir una única introducción seguida de dispersión y evolución en la zona, donde el virus podría haber establecido un ciclo endémico^{67,90}.

Eco-epidemiología del WNV

El WNV se mantiene en la naturaleza en un ciclo enzoótico entre mosquitos, que constituyen los vectores, y aves, que constituyen los reservorios epidemiológicos⁹¹. El WNV es considerado un generalista ecológico por la gran diversidad de hospedadores que puede infectar⁹². Lo más habitual es que se mantenga en un ciclo selvático o rural, circulando entre aves residentes en humedales y mosquitos ornitofílicos. En determinados casos, este ciclo puede desbordarse y pasar a convertirse en urbano, transmitiéndose entre aves sinantrópicas y mosquitos puente⁹³, pudiendo afectar ocasionalmente a otros hospedadores vertebrados e incluso al hombre.

Vectores artrópodos

Los mosquitos son el principal vector del WNV y solo aquellas especies en las que el virus replica y alcanza posteriormente las glándulas salivales vía hemolinfa son vectores competentes. En África, sur de Europa y Asia occidental, el WNV se ha aislado a partir de más de 40 especies competentes para la transmisión del virus, fundamentalmente pertenecientes al género *Culex*. De ellas, en África y Oriente Medio el principal vector es *Cx. univittatus*; en Europa, *Cx. pipiens*, *Cx. modestus* y *Coquillettidia richiardii* y en Asia, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus* y *Cx. vishnui*⁹³. En EE. UU. se han descrito más de 50 especies competentes, teniendo especial relevancia *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. restuans*. Además existen evidencias de transmisión vertical de WNV en mosquitos *Culex*, tanto en la naturaleza⁹⁴ como experimentalmente⁹⁵, así como de la capacidad de estos mosquitos para mantener el virus viable durante el invierno⁹⁶.

Por otra parte, el WNV se ha aislado tanto de garrapatas blandas (familia *Argasidae*, género *Argas*) como de garrapatas duras (familia *Ixodidae*, géneros *Hyalomma* y *Dermacentor*)^{88,97} y está descrita la transmisión vertical a las larvas y que éstas son capaces de transmitir el virus⁹⁸. La capacidad vectorial de las garrapatas no está bien establecida aún.

Aves

Las aves silvestres son el principal hospedador del WNV, desempeñando las aves migratorias un papel clave en su dispersión. En el Viejo Mundo se ha aislado WNV de diferentes aves residentes y migratorias, acuáticas y terrestres sin que se hayan observado casos de enfermedad o mortalidad reseñable a excepción de enfermedad neurológica en gansos domésticos⁹⁹ y cigüeñas en Israel en 1998¹⁰⁰ o, esporádicamente en Austria, Hungría, Francia, Italia y España^{43,45,62,64,67}. En Norteamérica se han encontrado 284 especies de aves distintas infectadas con WNV⁹² y, a diferencia de lo que ocurre en el Viejo Mundo, la tasa de mortalidad en muchas de ellas es muy elevada. Algunas especies (especialmente *Passeriformes*) son muy susceptibles a la infección por WNV y desarrollan elevadas viremias, que son infectivas para los mosquitos que se alimentan en ellas¹⁰¹. A pesar de que la transmisión de WNV es fundamentalmente debida a vectores artrópodos, diversos estudios han hallado diseminación del virus por las vías oral y cloacal, así como transmisión por contacto y por ingestión de carne contaminada (ratones infectados) en algunas de las especies estudiadas¹⁰¹. Algunos autores consideran que la mayor susceptibilidad al virus en aves de Norteamérica que en las del Viejo Mundo es la causa de la diferente epidemiología observada a ambos lados del Atlántico³¹. No obstante, la susceptibilidad de las aves euroafricanas a este virus no debe ser infravalorada, como demuestra un estudio reciente en el que un ave autóctona de la Península Ibérica como es la perdiz roja sufrió enfermedad mortal causada por cepas locales del virus¹⁰².

Otros hospedadores vertebrados

La infección por WNV se ha podido evidenciar (por detección de anticuerpos específicos en suero, o de antígeno o genoma o aislamiento del virus a partir de suero y/o tejidos) en una amplia variedad de especies de mamíferos, aunque es poco habitual que éstos desarrollen la enfermedad o se consideren reservorios importantes de este patógeno. Como excepción, los lémures y varias especies de ardillas son los únicos mamíferos que alcanzan niveles de viremia suficientes como para permitir la continuidad del ciclo biológico de WNV^{103–105}.

Los caballos y los seres humanos son también susceptibles a la infección por WNV, y aunque pueden llegar a enfermar, actúan como fondo de saco epidemiológico, ya que no alcanzan niveles de viremia suficientes como para infectar de nuevo a un mosquito. La tasa de enfermedad en caballos infectados es de un 10% con una estimación de que 1 de cada 3 caballos que padecen encefalitis acaban sucumbiendo a la enfermedad¹⁰⁶. En humanos, la mayoría de las infecciones por WNV son causadas por la picadura de mosquitos infectados. Sin embargo, aunque cuantitativamente de menor importancia, también están descritas otras vías de transmisión como son la intrauterina¹⁰⁷, la lactancia^{108,109}, las transfusiones de sangre¹¹⁰, el trasplante de órganos^{111,112}, y la inoculación intracutánea accidental en manipulaciones de laboratorio¹¹³.

Existen también diversos reptiles y anfibios susceptibles a la infección por WNV y, entre ellos, tanto los caimanes –*Alligator mississippiensis*–¹¹⁴ como la rana de lago –*Rana ridibunda*–^{115,116} son considerados reservorios competentes del virus.

Factores asociados a la emergencia del WNV

En las dos últimas décadas el WNV ha aumentado notablemente tanto su distribución geográfica como su incidencia. Los factores que pueden influir en esta emergencia del virus se pueden clasificar en dos tipos: 1) factores virológicos, y 2) factores ambientales.

Dentro de los factores virológicos debe mencionarse en primer lugar la emergencia de patogenicidad en aves. Durante las seis décadas siguientes a la identificación del WNV en Uganda en 1937, no se registraron casos reseñables de enfermedad o muerte en aves debidos a este virus. Sin embargo, en los brotes recientes de Israel y EE. UU. se ha detectado una elevada tasa de morbilidad y mortalidad en aves^{117,118}, como así mismo se han registrado casos esporádicos de enfermedad en distintas especies aviares en brotes recientes de WNV en Europa^{43,45,62,64,67}. Existe evidencia experimental que vincula la presencia de un determinado genotipo del virus a la virulencia en aves. Se ha observado que la posición 249 de la proteína NS3 (NS3₂₄₉) está ocupada por prolina (P) en la mayoría de las cepas virulentas de WNV, y que la sustitución de ésta por treonina (T) en la cepa altamente patogénica NY99 conduce a un descenso notable de su patogenicidad en cuervos americanos (*Corvus brachyrhynchos*), mientras que la sustitución inversa (P x T) en una cepa cercana de baja virulencia (Kenia/1998) supone un aumento significativo de patogenicidad en esta especie¹¹⁹. Esta mutación ha surgido a lo largo de la historia molecular del linaje 1 de WNV al menos en cuatro ocasiones, la última, en el Mediterráneo Occidental⁹⁰, pero estudios recientes no parecen confirmar una mayor patogenicidad para las cepas mediterráneas recientes del virus que la poseen, ni en ratones⁹⁰ ni en aves susceptibles¹⁰².

Por otro lado, la adaptación vírica a la replicación a altas temperaturas puede igualmente considerarse un factor virológico con influencia potencial en la emergencia reciente del virus. Diversos estudios muestran que desde 2002 el genotipo dominante en EE. UU. es el denominado WN02, aislado que se disemina más rápido y de forma más eficiente a temperaturas elevadas que el prototipo NY99 del que probablemente deriva^{120,121}.

En cuanto a los factores ambientales relacionados con la emergencia de WNV, se consideran tres tipos principales, según tengan relación con el clima, con los reservorios o con los vectores. Entre los primeros, el calentamiento global tiene un efecto directo en la emergencia del WNV ya que en mosquitos poiquiloterms, un aumento de la temperatura exterior provoca una mayor virogenesis y un período de incubación extrínseca más corto¹²². Por otro lado, un aumento en la duración de la temporada de transmisión favorece una expansión del virus a latitudes y altitudes más extremas¹.

Acerca de los factores que afectan a los reservorios, la composición y abundancia de las distintas especies de aves en un determinado ecosistema puede influir notablemente en la dinámica de transmisión. Se ha sugerido en diversos estudios que la biodiversidad está relacionada con la menor incidencia de la enfermedad^{123–125}, lo que podría explicar por qué en América hay menos casos de enfermedad por el WNV a medida que disminuye la distancia a los trópicos ya que en éstos la diversidad de especies aviares aumenta, y con ello la abundancia de hospedadores no competentes que actuarían amortiguando la transmisión por «efecto dilución». Sin embargo, a falta de evidencia directa, no pueden descartarse otras hipótesis, en particular una circulación de aislados de WNV menos virulentos³⁹ o una posible inmunidad cruzada frente a otros flavivirus, que protegería frente al WNV¹²⁶. En cuanto a los factores que dependen de los vectores, las variaciones en la composición/abundancia de los vectores competentes en una zona pueden influir de forma muy importante en la transmisión del WNV, y esto a su vez depende de factores climáticos, y biológicos (biodiversidad). Por otro lado, la presencia de flavivirus heterólogos (no-WNV) en la zona puede influir de diversas formas: por un lado, creando inmunidad cruzada en los reservorios, actuando como «barrera» inmunitaria contra la transmisión del WNV. Existen estudios donde se demuestra que en el gorrión común (*Passer domesticus*) una infección previa con WNV genera una protección cruzada frente a un posterior desafío con el SLEV, y viceversa, una primera infección con SLEV reduce los niveles de viremia de WNV tras una posterior inoculación del ave con dicho virus^{127,128}. No

obstante, la presencia previa del SLEV endémico en ciertas zonas de los EE. UU. no ha impedido la entrada del WNV sino que, muy al contrario, éste ha desplazado epidemiológicamente a aquél¹²⁹. En Europa, el único flavivirus circulante perteneciente al mismo sero-complejo que el WNV es el virus Usutu (USUV). Análogamente a lo sucedido en EE. UU. con SLEV y WNV, en Europa ambos virus WNV y USUV co-circulan en diversas zonas, como es el caso al menos de Austria, Hungría e Italia^{46,130,131}. Por otro lado, la propia infección de los vectores con flavivirus heterólogos podría afectar a su competencia para la transmisión del WNV. Un estudio reciente reveló que la infección previa de *Cx. quinquefasciatus* con un flavivirus de mosquito (Izabal) no afectó a su competencia para transmitir WNV inoculado a posteriori, pero al inocular ambos virus simultáneamente, se observó una mayor transmisibilidad del WNV por este vector¹³².

Patogénesis y respuesta inmune

El WNV replica en el sitio de la inoculación y de ahí se dirige a los nódulos linfáticos y al torrente sanguíneo¹³³. El paso del virus al sistema nervioso central (SNC) se produce debido al aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica tras lo que el WNV infecta directamente a las neuronas, en particular a las de los núcleos profundos y a las de la materia gris del cerebro, tronco del encéfalo y médula espinal^{134,135}.

La inmunidad celular es fundamental para resolver la infección del WNV en el SNC. Las células T CD8+ específicas frente al WNV secretan citoquinas proinflamatorias, que promueven la lisis de las neuronas infectadas por WNV, mientras que las células T CD4+ sustentan las respuestas específicas de las células T CD8+ que permiten la eliminación del WNV¹³⁶. En cuanto a la inmunidad humoral, recientemente se ha comprobado que diferentes estadios de maduración del virión influyen en la sensibilidad del WNV a su neutralización por anticuerpos¹³⁷. Por otra parte, diversos estudios en seres humanos sugieren que tanto una delección en el gen codificante del CCR5 (receptor de quimioquina), como la forma hipomórfica del alelo del gen OAS1 (oligoadenilato sintetasa), constituyen factores de riesgo para el desarrollo de una infección grave por WNV¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Sintomatología clínica

Alrededor de un 80% de las infecciones por WNV en humanos son asintomáticas, mientras que en el 20% restante la mayor parte suele desarrollar la denominada fiebre por WNV¹⁴¹. Ésta consiste en un inicio súbito de la enfermedad con presencia de fiebre, fatiga, malestar, cefalea, dolor muscular y debilidad, a veces acompañada de *rash* cutáneo. La forma neuroinvasiva de la enfermedad solo se manifiesta en aproximadamente 1 de cada 150 casos clínicos y lo hace en forma de meningitis, encefalitis o parálisis¹⁴¹. El riesgo de padecer encefalitis se incrementa con la edad y es mayor en personas inmunodeprimidas¹³⁴ o que han sufrido trasplante de órganos^{111,142}. Los signos clínicos que caracterizan los casos de encefalitis van desde una desorientación leve hasta signos de ataxia, temblores y/o parkinsonismos, que pueden desembocar en el coma o incluso la muerte del paciente, que ocurre entre un 4 y un 14% de los casos de enfermedad neuroinvasiva¹⁴³.

En caballos infectados por WNV, el período de incubación oscila entre 3 y 15 días¹⁰⁶ y la mayoría no muestran signos clínicos¹⁴⁴, aunque la ataxia es frecuente. Un 10% de los casos clínicos sufre una forma severa (encefalitis) con signos neurológicos. La tasa de mortalidad en estos casos es del 33%¹⁰⁶.

Aunque muchas especies de aves son resistentes a la enfermedad (incluidas algunas de producción como pollos y pavos), la infección suele ser fatal en aquellas especies susceptibles, entre

ellas el cuervo americano y ciertas rapaces¹⁰¹. En ocasiones, las aves muestran signos neurológicos antes de morir¹⁴⁵, como por ejemplo ataxia, temblores, desorientación, movimientos en círculo o posturas anormales¹⁰¹.

En roedores el virus es altamente neuroinvasivo y neurovirulento. La inoculación intraperitoneal de WNV en ratones generalmente conduce a una encefalitis fatal, de ahí que se considere un modelo útil para reproducir la enfermedad neurológica en humanos¹⁴⁶.

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la infección por WNV se basa en técnicas de detección del virus y/o su genoma (diagnóstico directo) y/o de anticuerpos frente a éste (diagnóstico indirecto). Con respecto a las primeras, la presencia del genoma vírico en muestras sanguíneas (suero, plasma, sangre total) o en líquido cefalorraquídeo (LCR) se determina habitualmente por reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR), habiéndose desarrollado diversos métodos para este fin, si bien es conveniente utilizar técnicas validadas para la detección de al menos aquellos linajes genéticos relevantes clínicamente, como los linajes 1 y 2 actualmente circulantes en Europa¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. La presencia de virus infectivo se pone de manifiesto mediante técnicas virológicas como el aislamiento del virus, normalmente en cultivo celular, que requiere posterior confirmación mediante RT-PCR, inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpo monoclonal o antisuero específicos, o neutralización *in vitro* con antisueros específicos. Las muestras empleadas con mayor frecuencia para la detección de virus son la sangre y el líquido cefalorraquídeo y, en especímenes *post-mortem*, los tejidos de elección son fundamentalmente el tejido nervioso (cerebro y médula espinal) en mamíferos y corazón, hígado, intestino, cerebro y riñón en aves. En la vigilancia epidemiológica del WNV también resulta de utilidad analizar la presencia del virus en mosquitos, para lo cual éstos se homogenizan y analizan por los mismos métodos mencionados anteriormente. En cuanto a las técnicas de detección de anticuerpos específicos, las hay de dos tipos: las de barrido, como el ensayo de inmunoenzimático (ELISA), el test de inhibición de la hemaglutinación (HIT) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI), y las de confirmación, más específicas, basadas fundamentalmente en la prueba de la virus-neutralización^{150,151}. Existe un alto grado de reactividad cruzada entre los flavivirus, tanto a nivel de género como entre miembros del mismo serogrupo. Por este motivo, se suele realizar una titulación en paralelo de la capacidad neutralizante de los sueros problema frente al WNV y a un segundo flavivirus del mismo serogrupo, de forma que la especificidad de los anticuerpos se determinará en base a las diferencias obtenidas en el título⁷⁴. El diagnóstico serológico de la infección aguda debe hacerse mediante la detección de anticuerpos IgM en suero y/o líquido cefalorraquídeo utilizando un ELISA de inmunocaptura y/o demostrando un incremento en el título de anticuerpos en sueros pareados tomados uno en la fase aguda y el otro, en fase convaleciente.

Tratamiento y prevención

Hasta la fecha no existe un tratamiento específico frente a la enfermedad por el WNV. Una de las aproximaciones terapéuticas más esperanzadoras es la inmunoterapia¹⁵². Otras terapias prometedoras se basan en el empleo de oligómeros antisentido, inhibidores del péptido de fusión o de la glicosilación, y compuestos sintéticos derivados de búsquedas automatizadas en librerías químicas¹⁵³. No existen vacunas autorizadas para su uso en humanos, pero hay cuatro vacunas para caballos y una para gansos domésticos registradas en EE. UU.⁹². De ellas, dos están basadas

en virus inactivados, una es un virus vivo recombinante, otra un virus quimérico, y en la última el inmunógeno consiste en ADN desnudo. En Europa hay una única vacuna para el WNV registrada en la Agencia Europea del Medicamento (para uso en caballos).

Entre las medidas de prevención de la enfermedad se cuentan también todas aquellas actuaciones ambientales que reduzcan las poblaciones locales de mosquitos, como el uso de insecticidas, el control de las aguas estancadas y la eliminación de lugares potenciales para la puesta de larvas.

Investigación sobre WNV y programas de vigilancia en España

La re-emergencia de la fiebre/encefalitis por WNV en Europa a partir de 1996, y sobre todo, su emergencia en EE. UU. en 1999 sirvió de revulsivo para estimular a la comunidad científica a estudiar esta enfermedad, que anteriormente era considerada de poca importancia. En España existen escasos estudios anteriores a esas fechas, efectuados en colaboración con investigadores portugueses, los cuales habían adquirido una valiosa experiencia en estudios de campo desde los años sesenta a raíz de los brotes ocurridos en su país. Fue a comienzos de 2003 cuando la Red de Investigación en Enfermedades Víricas Transmitidas por Artrópodos y Roedores (EVITAR), una iniciativa financiada por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), reuniendo experiencia multidisciplinar en este campo, sirvió para establecer colaboraciones que resultaron muy fructíferas durante su ejecución (2003-2005) y que han tenido continuidad hasta hoy. Grupos vinculados a esta red, pertenecientes al Centro Nacional de Microbiología-ISCIII (que la coordinó), la Estación Biológica de Doñana (CSIC), el Centro de Investigación en Sanidad Animal del INIA, y el Laboratorio Central de Veterinaria (MARM), etc., siguen investigando en colaboración en este tema, fundamentalmente en el seno de un proyecto del 7.º Programa marco de la UE (EuroWestNile). Otros grupos de investigación sobre el WNV activos en los últimos años en España se encuentran en el Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC-CSIC-UCLM) de Ciudad Real, en el Centro de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) en Barcelona, y en el Departamento de Biotecnología del INIA en Madrid. Desde 2007 se lleva a cabo en España la vigilancia epidemiológica de la enfermedad mediante un plan coordinado por el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, en colaboración con el Ministerio de Sanidad y las comunidades autónomas. El objetivo general del plan es la detección rápida y eficaz de cualquier brote de enfermedad por WNV que permita dar una respuesta adecuada por parte de las autoridades sanitarias.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a las siguientes instituciones el apoyo recibido: INIA (proyecto FAU 2008-00002-00-00) y 7.º Programa marco de la UE (proyecto EuroWestNile n.º 261391). Elena Sotelo Girón percibió una beca predoctoral del INIA durante la ejecución de este trabajo.

Nota añadida durante la edición

En septiembre de 2011, durante el proceso de publicación de este artículo, se han producido en España más casos de enfermedad por virus West Nile en caballos en España en las mismas zonas afectadas en 2010. Lo mismo ha ocurrido en otros países europeos, como Italia, Grecia y Rusia.

Bibliografía

- Brault AC. Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility. *Vet Res.* 2009;40:43.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004;10:S98–109.
- Beasley DW. Recent advances in the molecular biology of West Nile virus. *Curr Mol Med.* 2005;5:835.
- Chu JJ, Ng ML. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol.* 2004;78:10543–55.
- Medigeshi GR, Hirsch AJ, Streblow DN, Nikolich-Zugich J, Nelson JA. West Nile virus entry requires cholesterol-rich membrane microdomains and is independent of alphavbeta3 integrin. *J Virol.* 2008;82:5212–9.
- Heinz FX, Allison SL. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv Virus Res.* 2000;55:231–69.
- Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology.* 1989;169:354–64.
- Nowak T, Farber PM, Wengler G. Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology.* 1989;169:365–76.
- Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 1940;20:471–92.
- Melnick JL, Paul JR, Riordan JT, Barnett VH, Goldblum N, Zabin E. Isolation from human sera in Egypt of a virus apparently identical to West Nile virus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951;77:661–5.
- Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, Rizk F. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg.* 1956;5:579–620.
- Goldblum N, Jasinska-Klingberg W, Klingberg MA, Marberg K, Sterk VV. The natural history of West Nile Fever. I. Clinical observations during an epidemic in Israel. *Am J Hyg.* 1956;64:259–69.
- Joubert L, Oudart J, Hannoun C, Beytout D, Corniou B, Guillon JC, et al. Épidémiologie du virus West Nile: étude d'un foyer en Camargue. IV. La méningo-encéphalomyélite du cheval. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1970;118:239–47.
- Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950–2000. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:117–26.
- Filipe AR, De Andrade HR. Arboviruses in the Iberian Peninsula. *Acta Virol.* 1990;34:582.
- Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet.* 1998;352:767–71.
- Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina OY, Tyutyunnik EN, Frolochkina TI, Lanciotti RS, et al. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:128–32.
- Green MS, Weinberger M, Ben-Ezer J, Bin H, Mendelson E, Gandacu D, et al. Long-term Death Rates, West Nile virus epidemic, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1754–7.
- Bin H, Grossman Z, Pokamunski S, Malkinson M, Weiss L, Duvdevani P, et al. West Nile fever in Israel 1999–2000: from geese to humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:127–42.
- Banet-Noach C, Malkinson M, Brill A, Samina I, Yadin H, Weisman Y, et al. Phylogenetic relationships of West Nile viruses isolated from birds and horses in Israel from 1997 to 2001. *Virus Genes.* 2003;26:135–41.
- Weinberger M, Pitlik SD, Gandacu D, Lang R, Nassar F, Ben David D, et al. West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:686–91.
- Kopel E, Amitai Z, Bin H, Shulman LM, Mendelson E, Sheffer R. Surveillance of West Nile virus disease, Tel Aviv district, Israel, 2005 to 2010. *Euro Surveill.* 16.
- Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, et al. West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:1372–8.
- Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: The return after 35 years. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:692–6.
- Durand JP, Simon F, Tolou H. Virus West Nile: à nouveau en France chez l'homme et les chevaux. *Rev Prat.* 2004;54:703–10.
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. *Science.* 1999;286:2333–7.
- Ebel GD, DuPuis AP, Ngo K, Nicholas D, Kauffman E, Jones SA, et al. Partial genetic characterization of West Nile virus strains, New York state, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:650–3.
- Blitvich BJ. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim Health Res Rev.* 2008;9:71–86.
- Garmendia AE, Van Kruiningen HJ, French RA, Anderson JF, Andreadis TG, Kumar A, et al. Recovery and identification of West Nile virus from a hawk in winter. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3110–1.
- Murray KO, Mertens E, Despres P. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res.* 2010;41:67.
- Reiter P. West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro Surveill.* 2010;15:19508.

32. O'Leary DR, Nasci RS, Campbell GL, Marfin AA. From the Centers for Disease Control and Prevention. West Nile Virus activity—United States, 2001. *JAMA*. 2002;288:158–9.
33. DuPuis AP, Marra PP, Kramer LD. Serologic evidence of West Nile virus transmission, Jamaica, West Indies. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:860–3.
34. Komar O, Robbins MB, Klenk K, Blitvich BJ, Marlenee NL, Burkhalter K, et al. West Nile virus transmission in resident birds, Dominican Republic. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:1299–302.
35. Pupo M, Guzman MG, Fernandez R, Llop A, Dickinson FO, Perez D, et al. West Nile virus infection in humans and horses, Cuba. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1022–4.
36. Dupuis 2nd AP, Marra PP, Reitsma R, Jones MJ, Louie KL, Kramer LD. Serologic evidence for West Nile virus transmission in Puerto Rico and Cuba. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:474–6.
37. Quirin R, Salas M, Zientara S, Zeller H, Labie J, Murri S, et al. West Nile virus, Guadeloupe. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:706–8.
38. Llorón-Pino MA, Blitvich BJ, Farfan-Ale JA, Puerto FI, Blanco JM, Marlenee NL, et al. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:857–9.
39. Beasley DW, Davis CT, Estrada-Franco J, Navarro-Lopez R, Campomanes-Cortes A, Tesh RB, et al. Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:2221–4.
40. Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1559–61.
41. Bosch I, Herrera F, Navarro JC, Lentino M, Dupuis A, Maffei J, et al. West Nile virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:651–3.
42. Berrocal L, Peña J, González M, Mattar S. Virus del oeste del Nilo: ecología y epidemiología de un patógeno emergente en Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2006;8:218–28.
43. Jourdain E, Schuffenecker I, Korimbocou J, Reynard S, Murri S, Kayser Y, et al. West Nile virus in wild resident birds, Southern France, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007;7:448–52.
44. OIE. West Nile Fever, France [consultado 8/11/2010]. Immediate notification, 29/9/2006. World Organisation for Animal Health; 2006. Disponible en: <http://web.oie.int/wahis/public.php?page=home>.
45. Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:618–23.
46. Weissenböck H, Hubalek Z, Bakonyi T, Nowotny N. Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet Microbiol*. 2010;140:271–80.
47. European Center for Diseases Control, ECDC. West Nile Fever fact sheet. ECDC 2010 [consultado 3/9/2010]. Disponible en: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/basic_facts/Pages/factsheet_health_professionals.aspx.
48. ProMED-mail. West Nile fever, human – Israel [consultado 11/11/2010]. ProMED-mail 2004; 21 de septiembre. N.º acceso: 20040921.2608. Disponible en: <http://www.promedmail.org>.
49. ProMED-mail. WEST NILE VIRUS – ISRAEL [consultado 11/11/2010]. ProMED-mail 2010; 2 de agosto. N.º acceso: 20100802.2598. Disponible en: <http://www.promedmail.org>.
50. Rossini G, Cavrini F, Pierro A, Macini P, Finarelli A, Po C, Peret al. First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008 – case report. *Euro Surveill*. 2008;13, epublish.
51. Savini G, Monaco F, Calistri P, Lelli R. Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. *Euro Surveill*. 2008;13, pii: 19048.
52. Barzon L, Franchin E, Squarzon L, Lavezzo E, Toppo S, Martello T, et al. Genome sequence analysis of the first human West Nile virus isolated in Italy in 2009. *Euro Surveill*. 2009;14.
53. Barzon L, Squarzon L, Cattai M, Franchin E, Pagni S, Cusinato R, et al. West Nile virus infection in Veneto region, Italy, 2008–2009. *Euro Surveill*. 2009;14.
54. Rizzo C, Vescio F, Declich S, Finarelli AC, Macini P, Mattivi A, et al. West Nile virus transmission with human cases in Italy, August – September 2009. *Euro Surveill*. 2009;14.
55. OIE. West Nile Virus in Morocco [consultado 11/11/2010]. Immediate Notification, 17/08/2010: World Organisation for Animal Health; 2010. Disponible en: <http://web.oie.int/wahis/public.php?page=home>.
56. Schuffenecker I, Peyrefitte CN, el Harrak M, Murri S, Leblond A, Zeller HG. West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:306–9.
57. Parreira R, Severino P, Freitas F, Piedade J, Almeida AP, Esteves A. Two distinct introductions of the West Nile virus in Portugal disclosed by phylogenetic analysis of genomic sequences. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007;7:344–52.
58. Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, Vázquez A, Tenorio A, Rebreaanu R, et al. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill*. 2011;16.
59. Platonov AE, Fedorova MV, Karan LS, Shopenskaya TA, Platonova OV, Zhuravlev VI. Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol Res*. 2008;103:45–53.
60. Lvov DN, Shchelkanov Mlu, Dzharhenov AF, Galkina IV, Kolobukhina LV, Aristova VA, et al. Population interactions of West Nile virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) with arthropod vectors, vertebrates, humans in the middle and low belts of Volga delta in 2001–2006. *Vopr Virusol*. 2009;54:36–43.
61. Hachfi W, Bougmiza I, Bellazreg F, Bahri O, Kaabia N, Bahri F, et al. Une deuxième épidémie de méningo-encéphalite à virus West Nile en Tunisie. *Med Mal Infect*. 2010;40:456–61.
62. DEFRA. West Nile Virus: Austria. UK Department of Environmental, Food and Rural Affairs (/DEFRA); 2008. [actualizada 16 Oct 2008; consultada 19 Abr 2010]. Disponible en: <http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/monitoring/documents/wnv-austria.pdf>.
63. OIE. West Nile Fever, Bulgaria [consultado 11/11/2010]. Immediate notification, 6/10/2010: World Organisation for Animal Health; 2010. Disponible en: <http://web.oie.int/wahis/public.php?page=home>.
64. Jimenez-Clavero MA, Sotelo E, Fernandez-Pinero J, Llorente F, Blanco JM, Rodríguez-Ramos J, et al. West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1489–91.
65. OIE. West Nile Fever, Spain [consultado 8/11/2010]. Immediate notification, 10/09/2010: World Organisation for Animal Health; 2010. Disponible en: <http://web.oie.int/wahis/public.php?page=home>.
66. Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S. Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1176–80.
67. Sotelo E, Fernández-Pinero J, Llorente F, Vázquez A, Moreno A, Agüero M, et al. Phylogenetic relationships of Western Mediterranean West Nile virus strains (1996–2010) using full-length genome sequences: single or multiple introductions? *J Gen Virol*. 2011;92:2512–22.
68. Lozano A, Filipe AR. Anticuerpos frente a virus West Nile y otros virus transmitidos por artrópodos en la población del Delta del Ebro. *Rev Esp Salud Publica*. 1998;72:245–50.
69. González MT, Filipe AR. Antibodies to arboviruses in Northwestern Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 1977;26:792–7.
70. Chastel C, Launay H, Rogues G, Beaucournu JC. Arbovirus infections in Spain: serological survey on small mammals. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1980;73:384–90.
71. Bernabeu-Wittel M, Ruiz-Perez 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;25:561–5.
72. Figuerola J, Jimenez-Clavero MA, Lopez G, Rubio C, Soriguer R, Gomez-Tejedor C, et al. Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain. *Vet Microbiol*. 2008;132:39–46.
73. Lopez G, Jimenez-Clavero MA, Tejedor CG, Soriguer R, Figuerola J. Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8:615–21.
74. Figuerola J, Soriguer R, Rojo G, Gomez Tejedor C, Jimenez-Clavero MA. Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1915–7.
75. Hofle U, Blanco JM, Crespo E, Naranjo V, Jimenez-Clavero MA, Sanchez A, et al. West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Vet Microbiol*. 2008;129:171–8.
76. Jimenez-Clavero MA, Tejedor CG, Rojo G, Soriguer R, Figuerola J. Serosurvey of West Nile virus in equids and bovines in Spain. *Vet Rec*. 2007;161:212.
77. Jimenez-Clavero MA, Llorente F, Sotelo E, Soriguer R, Gomez-Tejedor C, Figuerola J. West Nile virus serosurveillance in horses in Doñana, Spain, 2005 to 2008. *Vet Rec*. 2010;167:379–80.
78. Bofill D, Domingo C, Cardenosa N, Zaragoza J, De Ory F, Minguell S, et al. Human West Nile virus infection, Catalonia, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1163–4.
79. Kaptoul D, Viladrich PF, Domingo C, Niubo J, Martínez-Yelamos S, De Ory F, et al. West Nile virus in Spain: report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis. *Scand J Infect Dis*. 2007;39:70–1.
80. Connell J, McKeown P, Garvey P, Cotter S, Conway A, O'Flanagan D, et al. Two linked cases of West Nile Virus (WNV) acquired by Irish tourists in the Algarve, Portugal. *Euro Surveill*. 2004;8.
81. Esteves A, Almeida AP, Galao RP, Parreira R, Piedade J, Rodrigues JC, et al. West Nile virus in Southern Portugal, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2005;5:410–3.
82. ProMED-mail. VNO, nuevo caso humano – España (Andalucía) [consultado 11/11/2010]. ProMED-mail 2010; 6 de octubre; N.º de acceso: 20101006.3626. Disponible en: <http://www.promedmail.org>.
83. Bondre VP, Jadhav RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA. West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol*. 2007;88:875–84.
84. Berthet FX, Zeller HG, Drouet MT, Raugier J, Digoutte JP, Deubel V. Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J Gen Virol*. 1997;78:2293–7.
85. Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the middle East. *Virology*. 2002;298:96–105.
86. Papa A, Bakonyi T, Xanthopoulou K, Vázquez A, Tenorio A, Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:920–2.
87. Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I, Nowotny N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:225–31.
88. Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Kovtunov AI, Prilipov AG, Kinney R, et al. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch Virol Suppl*. 2004;8:5–96.
89. Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Ruiz S, Molero F, Hernandez L, Moreno J, et al. Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:549–52.

90. Sotelo E, Fernandez-Pinero J, Llorente F, Aguero M, Hoeffle U, Blanco JM, et al. Characterization of West Nile virus isolates from Spain: New insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. *Virology*. 2009;395:289–97.
91. McLean RG, Ubico SR, Docherty DE, Hansen WR, Sileo L, McNamara TS. West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;951:54–7.
92. Kramer LD, Styer LM, Ebel GD. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol*. 2008;53:61–81.
93. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*. 1999;5:643–50.
94. Miller BR, Nasci RS, Godsey MS, Savage HM, Lutwama JJ, Lanciotti RS, et al. First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62:240–6.
95. Dohm DJ, Sardelis MR, Turell MJ. Experimental vertical transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2002;39:640–4.
96. Nasci RS, Savage HM, White DJ, Miller JR, Cropp CB, Godsey MS, et al. West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:742–4.
97. Hayes CG, Monath TP. West Nile Fever. En: The arboviruses: epidemiology and ecology. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989, 59–88.
98. Abbassy MM, Osman M, Marzouk AS. West Nile virus (*Flaviviridae:Flavivirus*) in experimentally infected Argas ticks (*Acari:Argasidae*). *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48:726–37.
99. Banet-Noach C, Simanov L, Malkinson M. Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese. *Avian Pathol*. 2003;32:489–94.
100. Malkinson M, Banet C. The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002;267:309–22.
101. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, et al. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:311–22.
102. Sotelo E, Gutierrez-Guzmán AV, Del Amo J, Llorente F, El-Harrak M, Pérez-Ramírez E, et al. Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge. *Vet Res*. 2011;42.
103. Rodhain F, Petter JJ, Albignac R, Coulanges P, Hannoun C. Arboviruses and lemurs in Madagascar: experimental infection of *Lemur fulvus* with yellow fever and West Nile viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1985;34:816.
104. Padgett KA, Reisen WK, Kahl-Purcell N, Fang Y, Cahoon-Young B, Carney R, et al. West Nile virus infection in tree squirrels (Rodentia: Sciuridae) in California, 2004–2005. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:810–3.
105. Platt KB, Tucker BJ, Halbur PG, Blitvich BJ, Fabiosa FG, Mullin K, et al. Fox squirrels (*Sciurus niger*) develop West Nile virus viremia sufficient for infecting select mosquito species. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8:225–33.
106. Castillo-Olivares J, Wood J. West Nile virus infection of horses. *Vet Res*. 2004;35:467–83.
107. Alpert SG, Ferguson J, Noel LP. Intrauterine West Nile virus: ocular and systemic findings. *Am J Ophthalmol*. 2003;136:733–5.
108. Centers for Disease Control and Prevention. Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding—Michigan, 2002. *JAMA*. 2002;288:1976–7.
109. Hayes EB, O'Leary DR. West Nile virus infection: a pediatric perspective. *Pediatrics*. 2004;113:1375–81.
110. Investigation of blood transfusion recipients with West Nile virus infections. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51:823.
111. Kumar D, Prasad GVR, Zaltzman J, Levy GA, Humar A. Community-acquired West Nile virus infection in solid-organ transplant recipients. *Transplantation*. 2004;77:399.
112. Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, et al. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med*. 2003;348:2196–203.
113. Laboratory-acquired West Nile virus infections—United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51:1133–5.
114. Klenk K, Snow J, Morgan K, Bowen R, Stephens M, Foster F, et al. Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:2150–5.
115. Kostiuikov MA, Gordeeva ZE, Bulychev VP, Nemova NV, Daniyarova OA. [The lake frog (*Rana ridibunda*)—one of the food hosts of blood-sucking mosquitoes in Tadzhikistan—a reservoir of the West Nile fever virus]. *Med Parazitol (Mosk)*. 1985;3:49–50.
116. Kostiuikov MA, Alekseev AN, Bulychev VP, Gordeeva ZE. [Experimental evidence for infection of *Culex pipiens* L. mosquitoes by West Nile fever virus from *Rana ridibunda* Pallas and its transmission by bites]. *Med Parazitol (Mosk)*. 1986;6:76–8.
117. Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kauffman EB, Ebel GD, DuPuis AP, et al. Comparison of West Nile virus infection in birds and mosquitoes in New York State in 2000. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:679–85.
118. Bin H, Grossman Z, Pokamunski S, Malkinson M, Weiss L, Duvdevani P, et al. West Nile fever in Israel 1999–2000 from geese to humans. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;951:127–42.
119. Brault AC, Huang CY, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA, Ramey WN, et al. A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virulence in American crows. *Nat Genet*. 2007;39:1162–6.
120. Kinney RM, Huang CY, Whiteman MC, Bowen RA, Langevin SA, Miller BR, et al. Avian virulence and thermostable replication of the North American strain of West Nile virus. *J Gen Virol*. 2006;87:3611–22.
121. Kilpatrick AM, Meola MA, Moudy RM, Kramer LD. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathogens*. 2008;4:e1000092.
122. Reisen WK, Fang Y, Martinez VM. Effects of temperature on the transmission of West Nile virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2006;43:309–17.
123. Johnson PT, Thielges DW. Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. *J Exp Biol*. 2010;213:961–70.
124. Swaddle JP, Calos SE. Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: observation of the dilution effect. *PLoS One*. 2008;3:e2488.
125. Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS. Effects of species diversity on disease risk. *Ecol Lett*. 2006;9:485–98.
126. Farfan-Ale JA, Llorón-Pino MA, García-Rejon JE, Hovav E, Powers AM, Lin M, et al. Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:85–95.
127. Reisen WK, Fang Y, Martinez VM. Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J Med Entomol*. 2005;42:367–75.
128. 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;75:480–5.
129. Reisen WK, Lothrop HD, Wheeler SS, Kensington M, Gutierrez A, Fang Y, et al. Persistent West Nile virus transmission and the apparent displacement St. Louis encephalitis virus in Southeastern California, 2003–2006. *J Med Entomol*. 2008;45:494–508.
130. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini A, Defilippo F, Maioli G, et al. Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PLoS One*. 2010;5:e14324.
131. Savini G, Monaco F, Terregino C, Di Gennaro A, Bano L, Pinoni C, et al. Usutu virus in Italy: An emergence or a silent infection? *Vet Microbiol*. 2011;151:264–74.
132. Kent RJ, Crabtree MB, Miller BR. Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with *Culex* Flavivirus Izabal. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(5):e671.
133. Diamond MS, Shrestha B, Mehlhop E, Sitati E, Engle M. Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunol*. 2003;16:259–78.
134. Guarner J, Shieh WJ, Hunter S, Paddock CD, Morken T, Campbell GL, et al. Clinicopathologic study and laboratory diagnosis of 23 cases with West Nile virus encephalomyelitis. *Hum Pathol*. 2004;35:983–90.
135. Kleinschmidt-DeMasters BK, Marder BA, Levi ME, Laird SP, McNutt JT, Escott EJ, et al. Naturally acquired West Nile virus encephalomyelitis in transplant recipients: clinical, laboratory, diagnostic, and neuropathological features. *Arch Neurol*. 2004;61:1210–20.
136. Sitati EM, Diamond MS. CD4+ T-cell responses are required for clearance of West Nile virus from the central nervous system. *J Virol*. 2006;80:12060–9.
137. Nelson S, Jost CA, Xu Q, Ess J, Martin JE, Oliphant T, et al. Maturation of West Nile virus modulates sensitivity to antibody-mediated neutralization. *PLoS Pathog*. 2008 May;4:e1000060.
138. Glass WG, Lim JK, Cholera R, Pletnev AG, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J Exp Med*. 2005;202:1087–98.
139. Diamond MS. Virus and host determinants of West Nile virus pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000452.
140. Lim JK, Lisco A, McDermott DH, Huynh L, Ward JM, Johnson B, et al. Genetic variation in OAS1 is a risk factor for initial infection with West Nile virus in man. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000321.
141. Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, Singer DA, Nash D, Cooper MJ, et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet*. 2001;358:261–4.
142. O'Leary DR, Marfin AA, Montgomery SP, Kipp AM, Lehman JA, Biggerstaff BJ, et al. The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2004;4:61–70.
143. Sejvar JJ, Haddad MB, Tierney BC, Campbell GL, Marfin AA, Van Gorp JA, et al. Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA*. 2003;290:511–5.
144. Ostlund EN, Andresen JE, Andresen M. West Nile encephalitis. *Vet Clin N Am-Equine Pract*. 2000;16:427–41.
145. Steele KE, Linn MJ, Schoepp RJ, Komar N, Geisbert TW, Manduca RM, et al. Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Vet Pathol*. 2000;37:208–24.
146. Beasley DW, Li L, Suderman MT, Barrett AD. West Nile virus strains differ in mouse neurovirulence and binding to mouse or human brain membrane receptor preparations. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;951:332–5.
147. Jimenez-Clavero MA, Agüero M, Rojo G, Gomez-Tejedor C. A new fluorogenic real-time RT-PCR assay for detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile viruses. *J Vet Diagn Invest*. 2006;18:459–62.
148. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods*. 2007;146:355–8.

149. Tang Y, Anne Hapip C, Liu B, Fang CT. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *J Clin Virol.* 2006;36:177–82.
150. Shi PY, Wong SJ. Serologic diagnosis of West Nile virus infection. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003;3:733–41.
151. Sotelo E, Llorente F, Rebollo B, Camuñas A, Venteo A, Gallardo C, et al. Development and evaluation of a new epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to West Nile virus. *J Virol Methods.* 2011;174:35–41.
152. Oliphant T, Engle M, Nybakken GE, Doane C, Johnson S, Huang L, et al. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat Med.* 2005;11:522–30.
153. Diamond MS. Progress on the development of therapeutics against West Nile virus. *Antiviral Res.* 2009;83:214–27.