

SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**INFECCIÓN NEUROLÓGICA POR VIRUS
TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA:
ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO**

Sara Sanbonmatsu Gámez

Granada, 2005

El Dr. José María Navarro Marí, Jefe de Sección del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y el Dr. Francisco Morillas Márquez, director y profesor titular del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral que presenta la Licenciada Sara Sanbonmatsu Gámez “INFECCIÓN NEUROLÓGICA POR VIRUS TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA: ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO” ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, abril de 2005

Fdo: José María Navarro Marí

Fdo: Francisco Morillas Márquez

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ARBOVIRUS

I.2. BUNYAVIRIDAE

I.2.1. ESTRUCTURA VÍRICA

I.2.1.1. MORFOLOGÍA

I.2.1.2. ORGANIZACIÓN GENÉTICA

I.2.1.3. PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

I.2.2. TAXONOMÍA

I.2.3. CICLO VITAL

I.3. PHLEBOVIRUS

I.3.1. VIRUS DEL GRUPO DE LA FIEBRE DE LOS FLEBOTOMOS

I.4. VIRUS TOSCANA

I.4.1. HISTORIA

I.4.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y ANTIGÉNICAS

I.4.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

I.4.4. EPIDEMIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

I.4.5. DIAGNÓSTICO

I.4.5.1. AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR

I.4.5.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

I.4.5.3. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

I.4.6. SITUACIÓN ACTUAL DEL CONOCIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS TOSCANA EN ESPAÑA

I.5. FLEBOTOMOS

I.5.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

I.5.2. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DIFERENCIALES DE LOS ADULTOS

I.5.2.1. CABEZA

I.5.2.2. TÓRAX

I.5.2.3. ABDOMEN

I.5.3. CICLO VITAL

I.5.4. ECOLOGÍA, HÁBITOS Y FENOLOGÍA

I.5.5. IMPORTANCIA SANITARIA EN HUMANOS

I.5.5.1. PAPEL COMO VECTOR DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN ANIMALES Y HUMANOS

I.5.5.2. PAPEL COMO RESERVORIOS: TRANSMISIÓN SEXUAL Y VERTICAL DE VIRUS PATÓGENOS

I.5.6. DETECCIÓN DE VIRUS A PARTIR DE FLEBOTOMOS U OTROS ARTRÓPODOS

I.5.6.1. CAPTURA

I.5.6.2. CULTIVO

I.5.6.3. BIOLOGÍA MOLECULAR

II. OBJETIVOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ESTUDIO SEROPREVALENCIA

III.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

III.1.2.DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE A VTOS

III.2 ESTUDIO CLÍNICO

III.2.1. PACIENTES Y MUESTRAS

III.2.2. MÉTODOS

III.2.2.1. AISLAMIENTO DE VIRUS EN CULTIVO CELULAR

III.2.2.2. IDENTIFICACIÓN DE VIRUS AISLADOS EN CULTIVO CELULAR

III.2.2.2.A Inmunofluorescencia para identificación de virus a partir de líneas celulares infectadas en cultivo tradicional

III.2.2.2.B. Pruebas físico-químicas

III.2.2.2.B.i. INHIBICIÓN DE VIRUS DNA CON 5-BROMO-2-DESOXIURIDINA

III.2.2.2.B.ii- TRATAMIENTO CON CLOROFORMO

III.2.2.2.B.iii- TRATAMIENTO CON pH ÁCIDO

III.2.2.2C. Neutralización del ECP

III.2.2.3. DETECCIÓN DE VIRUS MEDIANTE PCR

III.2.2.3.A. Extracción de ácidos nucleicos

III.2.2.3.A.i. EXTRACCIÓN PARA VVZ, VHS

III.2.2.3.A.ii. EXTRACCIÓN PARA VIRUS RNA

III.2.2.3.B. Amplificación de ácidos nucleicos

III.2.2.3.B.i. VVZ, VHS Y ENTEROVIRUS

III.2.2.3.B.ii. RT-PCR SECUENCIAL (NESTED) PARA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

III.2.2.3.C. Detección de los productos de amplificación de PCR

III.2.2.4.SEROLOGÍA: DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE A VIRUS TOSCANA

III.2.2.4.A. EIA Enzywell Toscana virus IgG

III.2.2.4.B. EIA Enzywell Toscana virus IgM

III.2.2.4.C. Neutralización del efecto citopático

III. 3. ESTUDIO VECTORES

III.3.1. ESTACIONES DE CAPTURA

III.3.2. CAPTURA DE FLEBOTOMOS

III.3.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS FLEBOTOMOS

III.3.3.1. TRANSPARENTADO

III.3.3.2. MONTAJE

III.3.3.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS FLEBOTOMOS ESPAÑOLES

III.3.4. AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE PHLEBOVIRUS EN LOS FLEBOTOMOS

III.4. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE PHLEBOVIRUS AISLADOS EN GRANADA

III.4.1. MÉTODO

III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

IV. RESULTADOS

IV. 1. ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA

IV.2. ESTUDIO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA

IV.3. IDENTIFICACIÓN DE VECTORES DE VIRUS TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA

IV.4. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS CEPAS DE VIRUS TOSCANA AISLADOS EN LA PROVINCIA DE GRANADA

V. DISCUSIÓN

V.1. SEROPREVALENCIA FRENTE A VIRUS TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA

V.2. IMPLICACIÓN DE VIRUS TOSCANA EN CUADROS NEUROLÓGICOS EN LA PROVINCIA DE GRANADA

V.3. VECTORES DE VIRUS TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA

V.4. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE VIRUS TOSCANA AISLADOS EN LA PROVINCIA DE GRANADA

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFÍA

I. INTRODUCCIÓN

I.INTRODUCCIÓN

El virus Toscana (vTOS) es un arbovirus transmitido por flebotomos que se incluye dentro del género *Phlebovirus*, de la familia *Bunyaviridae*. Descrito originariamente en Italia (Verani y cols, 1980), posteriormente se ha detectado su presencia en muchas regiones del área mediterránea como Portugal (Ehrnst y cols, 1985), (Schwarz y cols, 1995), Italia (Calisher y cols, 1987), (Nicoletti y cols, 1991), (Schwarz y cols, 1995), (Valassina y cols, 1998), Chipre (Eitrem y cols, 1990) Francia (Hermersbach-Miller y cols, 2004) y desde 1988 también en España (Eitrem y cols, 1991), (Mendoza-Montero y cols, 1998), (Echevarría y cols, 2003), (Navarro y cols, 2004) asociado fundamentalmente a cuadros de meningitis o meningoencefalitis.

Dada su reciente descripción, todavía existen muchos aspectos relativos a su ciclo biológico, epidemiología y patogenia en humanos que se desconocen.

I.1. ARBOVIRUS

Los Arbovirus son un grupo heterogéneo de virus, pertenecientes a distintas familias y géneros con la característica común de ser transmitidos por artrópodos. La palabra Arbovirus deriva de la descripción de este grupo en inglés ARthropod BOrne VIRUSes.

Hay 534 especies víricas registradas en el Catálogo Internacional de Arbovirus (Karabatsos, 1985). La mayoría de ellos pertenecen a las familias Togaviridae, Flaviviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae y Bunyaviridae. Prácticamente todos ellos son virus ARN.

El ciclo natural de los Arbovirus ocurre, generalmente, en dos fases; en el artrópodo hematófago se produce una multiplicación y amplificación del virus que posteriormente se transmitirá al hospedador vertebrado a través de la saliva del artrópodo vector cuando éste pica al vertebrado para alimentarse con

su sangre. En el huésped vertebrado el virus se multiplica y ha de producir una viremia de título y duración suficiente para permitir que el ciclo se cierre cuando un nuevo artrópodo hematófago le pique y se alimente con su sangre infectada. La infección vírica en los vertebrados suele ser aguda y autolimitada, mientras que los artrópodos permanecen infectados de por vida. Por otro lado se ha descrito la transmisión transovárica y sexual en artrópodos para algunos de estos virus como Rio Grande (Endris y cols, 1983), Valle del Rift (Linthicum y cols, 1985), LaCrosse (Thompson y Beaty, 1978), Dengue (Rosen, 1987), Sindbi (Oveden y Mahon, 1984), virus de la fiebre de los flebotomos (Ciufolini y cols, 1985), (Tesh y Chaniotis, 1975), (Tesh y cols, 1992).

De los 534 arbovirus descritos, 134 han demostrado ser causa de enfermedad en humanos. Lo más frecuente es que la infección en humanos se produzca de forma casual, cuando un vector pica accidentalmente al hombre para alimentarse en vez de a su huésped vertebrado principal. El resultado de este ciclo suele ser una vía muerta para la transmisión del virus, debido a que el hombre no es, en general, el huésped preferido del artrópodo hematófago, y por tanto habrá pocas posibilidades de que otro artrópodo vuelva a picarle y/o también porque la viremia en humano sea de corta duración y/o de bajo título.

Los principales reservorios vertebrados para los arbovirus de importancia en salud pública son las aves y los roedores, y los principales vectores son los mosquitos y garrapatas (Gubler, 2002).

Aunque algunos arbovirus tienen distribución universal, otros tienen una distribución geográfica más restringida, ya que se han adaptado a un binomio vector transmisor/huésped vertebrado específico. La distribución geográfica de los arbovirus viene determinada en gran medida por el rango de sus artrópodos vectores. Por eso es muy importante a la hora del diagnóstico clínico de estas infecciones establecer la historia de viajes y posibles exposiciones del paciente.

La incidencia de estas infecciones tiende a presentar un patrón estacional, siendo mayor durante la estación veraniega en las regiones

templadas y en las lluviosas en los trópicos, debido a la mayor actividad de los vectores durante estas estaciones.

La mayoría de las infecciones por arbovirus son asintomáticas. El cuadro clínico, cuando se manifiesta, puede ser muy variado; desde un síndrome febril autolimitado, indistinguible clínicamente de otras infecciones víricas comunes, ocasionalmente exantemático, hasta graves cuadros neurológicos graves o fiebres hemorrágicas, que pueden ser mortales. En general, las manifestaciones clínicas en humanos debidas a la infección por arbovirus se pueden dividir en cuatro categorías: fiebre (incluidos los cuadros febriles exantemáticos), fiebre hemorrágica, encefalitis o meningitis, y poliartritis. Aparte de los cuadros febriles autolimitados, que suele ser la manifestación más común de la mayoría de arbovirosis, algunos virus se asocian de modo particular a alguna de las restantes patologías descritas, destacando en este sentido:

- Como causantes de fiebres hemorrágicas: flavivirus (Dengue o fiebre amarilla) (Burke y Monath, 2001); nairovirus (virus Fiebre hemorrágica Congo.Crimea (CCHF) y phlebovirus (Fiebre del Valle del Rift) (Nichols, 2001)

- Asociados a cuadros neurológicos: flavivirus (virus de la Encefalitis de San Luis, virus de la Encefalitis Japonesa, West Nile, virus de la Encefalitis transmitidas por garrapatas) (Burke y Monath, 2001); alfavirus (Encefalitis Equina del Este y del Oeste) (Griffin, 2001); bunyavirus (La Crosse) y phlebovirus como Toscana y Fiebre del Valle del Rift (Nichols, 2001)

- Productores de poliartritis dolorosa: alfavirus (Griffin, 2001) como Ross River, chikungunya y Barmah Forest. (Beaty y cols, 1995).

En la Tabla1 se muestra un resumen de los arbovirus más importantes para el hombre junto con sus vectores, reservorios, manifestaciones clínicas y distribución geográfica

Tabla.1. Arbovirus de mayor importancia clínica para el hombre

Virus	Vector	Huésped	Clínica^a	Distr. geográfica^b
<u>Togaviridae / Alphavirus</u>				
Chikungunya	Mosquitos	Humanos, primates	SF, A	Áf, As
Ross River	Mosquitos	Humanos, marsupiales	SF, A	O
Mayaro	Mosquitos	Aves	SF	Sur A
O'nyong-nyong	Mosquitos	¿?	SF	Af
Sinbis	Mosquitos	Aves	SF	As, Af, O, E, A
Barmah Forest	Mosquitos	¿?	SF, A	O
Encefalitis equina del Este	Mosquitos	Aves	SF, ME	A
Encefalitis equina del Oeste	Mosquitos	Aves, conejos	SF, ME	A
Encefalitis equina Venezolana	Mosquitos	Roedores	SF, ME	A
<u>Flaviviridae /Flavivirus</u>				
Dengue 1-4	Mosquitos	Humanos, primates	SF, HF	Trópicos
Fiebre amarilla	Mosquitos	Humanos, primates	SF, HF	Af, Sur A
Encefalitis Japonesa	Mosquitos	Aves, cerdos	SF, ME	As, Pacífico
Encefalitis del valle Murray	Mosquitos	Aves	SF, ME	Australia
Rocío	Mosquitos	Aves	SF, ME	Sur A
Encefalitis de San Luis	Mosquitos	Aves	SF, ME	A
West Nile	Mosquitos	Aves	SF, ME	Af, E, Norte A
Enfermedad del bosque de Kyasanar	Garrapatas	Primates, roedores, camellos	SF, FH, ME	India, Arabia Saudí
Fiebre hemorrágica de Omsk	Garrapatas	Roedores	SF, FH	As
Encefalitis transmitida por garrapatas	Garrapatas	Aves, roedores	SF, ME	E, As, Norte A
<u>Bunyaviridae /Phlebovirus</u>				
Fiebre de los flebotomos	Flebotomos	¿?	SF	E, Af, As
Fiebre del valle del Rift	Mosquitos	¿?	SF, ME, M, FH	Af, Oriente Medio
Toscana	Flebotomos	¿?	SF, ME, M	Mediterráneo
<u>Bunyaviridae /Bunyavirus</u>				
Encefalitis de La Crosse	Mosquitos	Roedores	SF, ME	Norte A
Encefalitis de California	Mosquitos	Roedores	SF, ME	Norte A, E, As
Oropouche	Jejenes	¿?	SF	A
<u>Bunyaviridae /Nairovirus</u>				
Fiebre hemorrágica de Congo-Crimea	Garrapatas	Roedores	SF, FH	E, As, Af

^aSF= Síndrome febril, ME= meningoencefalitis, FH= fiebre hemorrágica, M= meningitis, A= artritis

^bA= América, As= Asia, Af= África, E= Europa, O= Oceanía (Gubler, 2002)

Desde hace dos décadas se detecta un mayor incremento de arbovirosis desconocidas y/o de arbovirosis que se creían controladas o que se han introducido en nuevas áreas geográficas que antes no se veían afectadas, ocasionando serios problemas de salud pública.

La emergencia o reemergencia de estas enfermedades se debe a múltiples factores, entre ellos: el crecimiento de la población mundial con el consiguiente aumento de la urbanización de zonas antes despobladas, la incursión de la actividad humana en nuevos ecosistemas, el incremento de la movilidad de la población, el desarrollo de las comunicaciones que permite viajar a cualquier parte del mundo en muy poco tiempo, cambios climáticos y el colapso de los programas de salud pública y de control de los vectores (Gubler, 2002). Algunos ejemplos de esta reemergencia son las epidemias recientes de Dengue, fiebre amarilla (Robertson y cols, 1996), (WHO, 2000), (Van der Stuyft y cols, 1999), fiebre del Valle del Rift (Meegan, 1981), (WHO, 1998), (WHO, 2000), encefalitis japonesa (Rojanasuphot y Tsai, 1995), (Paul y cols, 1990), (Hanna y cols, 1995), encefalitis por virus West Nile (Hubalek y Halouzka, 1999), (Marfin y Gubler, 2001), (Giladi y cols, 2001), (Nash y cols, 2001) o encefalitis equina venezolana (Rico-Hess y cols, 1995), (Rivas y cols, 1995).

En Europa las arbovirosis más descritas son la encefalitis transmitida por mordedura de garrapatas, sobre todo en países centroeuropeos, e infecciones transmitidas por picadura de flebotomos (virus Nápoles, Sicilia y Toscana) en países ribereños del Mediterráneo. No obstante, cada vez se comunican con más frecuencia casos esporádicos de encefalitis por virus West-Nile, y existe gran preocupación por la introducción de arbovirosis propias de otras latitudes como virus Chikungunya, Sinbis o Fiebre del valle del Rift.

I.2. FAMILIA *BUNYAVIRIDAE*

En la última clasificación taxonómica de virus, 7º informe del International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), la familia *Bunyaviridae* comprende unos 150 virus distribuidos en cinco géneros: *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Plebovirus* y *Tospovirus* (Van Regenmortel y cols, 2000).

Tienen unas características estructurales comunes como el genoma RNA tri-segmentado (segmentos S, M y L), casi siempre de polaridad negativa y el patrón de codificación de proteínas en cada segmento del genoma que también es bastante parecido en todas las especies (Nichols, 2001).

Algunos de estos virus son causa de importantes enfermedades humanas como: virus California (*Bunyavirus*), virus de la fiebre del Valle del Rift (*Phlebovirus*), Hantaan virus (*Hantavirus*), virus de la fiebre hemorrágica Crimen-Congo (*Nairovirus*) (Nichols, 2001).

Los bunyavirus en general dependen de animales como huéspedes para persistir en la naturaleza ya que normalmente no ocurre la transmisión humano-humano, siendo el hombre un huésped final en el que termina la cadena de transmisión.

La mayoría de los miembros de esta familia son Arbovirus, que causan una infección crónica no letal en los artrópodos hematófagos que se comportan como vectores y en ocasiones como reservorio. Las excepciones son los *Tospovirus*, que son virus de plantas y los *Hantavirus* cuyos huéspedes son roedores y no tienen ningún artrópodo vector (Nichols, 2001).

En la naturaleza cada especie de virus infecta un número limitado de huéspedes vertebrados e invertebrados.

I. 2.1. ESTRUCTURA VÍRICA

I.2.1.1. MORFOLOGÍA

Los viriones tienen tamaños que van de 80 a 120 nm, la mayoría de ellos entre 92 a 105 nm. Son esféricos o pleomórficos, según el método de fijación utilizado.

La envuelta está compuesta por una bicapa lipídica de 4-5 nm de espesor que contiene espículas glicoproteicas de 8-10 nm de longitud. Rodea al núcleo consistente en el genoma asociado a proteínas.

Todos los Bunyaviridae tienen dos glicoproteínas designadas como G1 y G2, salvo en algunas especies de *Nairovirus* que tienen tres.

La envuelta no procede de la membrana plasmática de las células infectadas sino de vesículas intracitoplasmáticas asociadas al aparato de Golgi.

La liberación de los viriones se produce bien por muerte y ruptura de la célula infectada o por transporte a la superficie celular de las vesículas conteniendo viriones ensamblados (Schmaljohn y Hooper, 2001).

Los Bunyaviridae contienen un RNA sencillo, de polaridad negativa en la mayoría de ellos, dividido en tres segmentos: grande (L, Large), mediano (M, Medium) y pequeño (S, Small). (Figura 1)

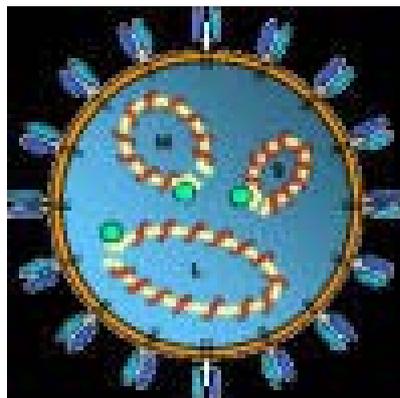


Figura 1. Representación esquemática de la morfología de un virus de familia *Bunyaviridae*

I.2.1.2. ORGANIZACIÓN GENÉTICA

Las secuencias génicas de diferentes virus genéticamente relacionados (virus de un mismo complejo o serogrupo dentro de un mismo género) pueden recombinarse cuando se coinfectan cultivos celulares.

Todos los miembros de la familia parecen usar la misma estrategia codificadora. El segmento de RNA L codifica una proteína grande (proteína L) que es una polimerasa. El segmento M codifica las glicoproteínas G1 y G2; y el segmento S codifica la proteína de la nucleocápside (proteína N). También hay una serie de proteínas no estructurales (NS) que en algunos casos se han asociado a un segmento RNA concreto.

Cada partícula vírica contiene tres nucleocápsides compuestas por el genoma asociado a varias copias de proteína N y unas pocas copias de la proteína L o polimerasa. Cada nucleocápside se estructura en un círculo cerrado mediante una unión no covalente.

Aunque la mayoría de las especies de Bunyaviridae son RNA polaridad negativa, y las proteínas están codificadas en el RNA complementario viral, existen estrategias ambisense en los *Phlebovirus* con el segmento S y en los *Tospovirus* con el segmento M (Schmaljohn y Hooper, 2001).

GENOMA RNA (-) BUNYAVIRIDAE

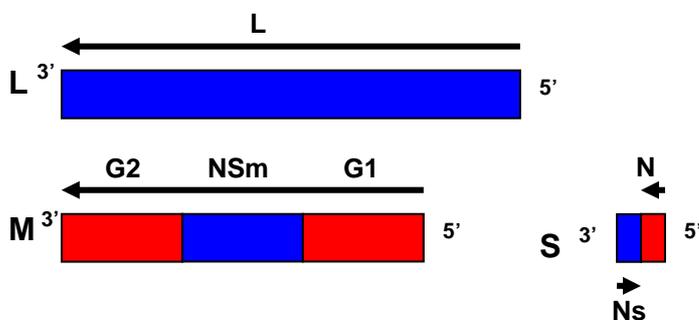


Figura 2. Esquema de organización genómica de virus de familia *Bunyaviridae* en tres segmentos

I.2.1.3. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

La constante de sedimentación de Bunyaviridae es de unos 450 S. El virión está compuesto por un 2% de RNA, 58% proteínas, lípidos (20-30%) y carbohidratos (2-7%) (Schmaljohn y Hooper, 2001).

Los disolventes lipídicos y detergentes destruyen la envuelta lipídica del virus, con lo que pierden su infectividad para artrópodos y mamíferos. (Schmaljohn y Hooper, 2001). También se inactivan a 56°C o más de temperatura y a pH ácido.

I.2.2. TAXONOMÍA

Las características moleculares de genomas y proteínas se han usado para definir los distintos géneros dentro de esta gran familia, mientras que las particularidades antigénicas han servido para separar y agrupar virus dentro de cada género.

Por otro lado, la taxonomía de los *Bunyaviridae* se ha basado en métodos serológicos como la neutralización, inhibición de la hemaglutinación (IH), fijación de complemento (FC), o enzimoimmunoensayo (ELISA), que siguen siendo los métodos de elección para identificarlos.

La neutralización e IH son pruebas bastante específicas para los determinantes antigénicos de las glicoproteínas virales, codificadas por el segmento M del genoma. La FC sin embargo, está más dirigida hacia los antígenos de las proteínas de la nucleocápside, codificadas por el segmento S del RNA. En general, los determinantes antigénicos de la nucleocápside están más conservados que los de las glicoproteínas y por tanto la reacción de FC se usa para identificar antígenos que comparten más de una especie de virus, mientras que la IH y la neutralización son más útiles para diferenciar entre virus más parecidos y relacionados (Tesh y cols, 1982)

Actualmente con los avances en biología molecular cada vez es más frecuente y fácil la secuenciación de los genomas de los virus amplificados mediante RT-PCR, lo que permite realizar mapas genéticos de algunos virus. Normalmente los datos serológicos se correlacionan bastante bien con los mapas genéticos obtenidos y la tendencia será a usar esta tecnología como herramienta para la clasificación y taxonomía de estos virus.

En la actualidad existen cinco géneros dentro de la familia *Bunyaviridae* y varios virus sin género asignado. Dentro de cada género hay diversos serogrupos o complejos genéticos. En tabla 2 se muestran algunos de los virus más representativos de cada género o con mayor importancia para el hombre.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de los principales virus de la familia *Bunyaviridae*

Género	Serogrupo o complejo genético	Nº de virus	Virus representativos
<i>Orthobunyavirus</i>	Bunyamwera	32	Bunyamwera
	California	14	California encefalitis La Crosse
	Simbu	24	Oropouche
<i>Hantavirus</i>	Hantaan	17	Hantaan Seúl
	Puumala	11	Puumala
	Síndrome Pulmonar Hantavirus	2	Sin Nombre
<i>Nairovirus</i>	Crimean Congo Hemorrhagic fever	3	CCHF
<i>Phlebovirus</i>	Sandfly fever	23	Nápoles Toscana Rift Valley
	Uukuniemi	12	Uukuniemi
	Sin grupo	16	Sicilia
<i>Tospovirus</i>	Tomato Spotted kilt	2	Tomato spotted kilt
Sin asignar		42	

I.3. PHLEBOVIRUS

El género *Phlebovirus* comprende alrededor de 50 virus, separados en complejos antigénicos, que exhiben características moleculares que los distinguen de otros géneros de la familia *Bunyaviridae*. Hay dos grandes grupos dentro de este género, los virus del grupo de la fiebre de los flebotomos y los virus del grupo Uukuniemi (Karabatsos, 1985). Dentro del primer grupo, los virus más importantes desde el punto de vista médico son los virus de la fiebre del valle del Rift (vRVF), virus Nápoles (VN), virus Sicilia (VS) y vTOS.

La transmisión de la mayoría de los virus de este género es a través de pequeños dípteros de los géneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, y *Lutzomyia* (Tesh, 1988; Tesh y cols, 1986; Travassos da Rosa y cols, 1983; Dohm y cols, 2000) *Phlebotomus spp* son los principales vectores en el Viejo Mundo, y la enfermedad se asocia a entornos áridos, rurales y agrícolas, mientras que en América lo vectores son *Lutzomyia spp* y el nicho ecológico es tropical. Sin embargo, hay importantes excepciones como los virus del grupo Uukuniemi que son transmitidos por garrapatas de la especie *Ixodes ricinus* (Oker-Bloom y cols, 1964) y vRVF que tiene como principales vectores a mosquitos (Lithicum y cols, 1985; Logan y cols, 1991), aunque también los flebotomos sean capaces de transmitirlo (Turell y Perkins, 1990).

I.3.1. GRUPO VIRUS DE LA FIEBRE DE LOS FLEBOTOMOS

Este grupo de virus está ampliamente distribuido y comprende más de 37 virus, de los que los más importantes son los citados virus de la fiebre del valle del Rift, virus Nápoles, virus Sicilia y virus Toscana. Se sabe poco acerca de los reservorios vertebrados de estos virus. Se han detectado u obtenido aislamientos de virus de algunos animales salvajes como murciélagos (Boiro y cols, 1987; Oelofsen y Van der Ryst, 1999; Verani y cols, 1988), así como evidencias serológicas de infección en pequeños mamíferos, y sin embargo, no se han observado síntomas de enfermedad en estos supuestos huéspedes vertebrados (Pretorius y cols, 1997). Algunos investigadores sugieren la

posibilidad de que el papel de los vertebrados sea únicamente aportar la sangre necesaria para la maduración de los huevos de los flebotomos (Tesh, 1988). Estas conclusiones se basan en los numerosos hallazgos de machos infectados con *Phlebovirus* (Verani y cols, 1988) la demostración de la transmisión transovárica de muchos de los miembros de este grupo de virus (Endris y cols, 1983) y el establecimiento de línea de *Phlebotomus perniciosus* capaces de transmitir por vía transovárica persistentemente virus Toscana (Tesh y Modi, 1987; Maroli y cols, 1993), aunque debe existir algún mecanismo de amplificación del virus, ya que la tasa de infección disminuye en cada generación (Tesh y Modi, 1987).

Tradicionalmente vRVF circulaba en la mayoría de los países del África subsahariana (Gubler, 2002), pero en los últimos 25 años se ha expandido a nuevas áreas geográficas como Egipto (Meegan, 1981) y Oriente Medio (WHO, 1998; WHO, 2000). Periódicamente ocurren brotes epizooticos después de lluvias intensas en zonas ganaderas (Meegan, 1981). Los rebaños o de ovejas, vacunos, etc, sirven de huéspedes amplificadores del virus, que a su vez hacen que se infecten más mosquitos. El reservorio vertebrado natural no se conoce, aunque, como se ha comentado anteriormente, se ha aislado vRVF de murciélagos (Boiro y cols, 1987; Oelofsen y cols, 1999) y existen evidencias serológicas de infección en pequeños mamíferos africanos (*Aethomys namaquensis*) sin síntomas clínicos (Pretorius y cols, 1997). En vacas y ovejas la infección por vRVF se asocia a abortos y alta tasa de mortalidad, causando importantes pérdidas económicas. En humanos, vRVF puede producir fiebres hemorrágicas y meningoencefalitis fatales en un pequeño porcentaje de los individuos infectados, cursando la mayoría de las infecciones como cuadros febriles pseudogripales o de forma asintomática (Nichol, 2001).

Los virus Nápoles y Sicilia producen en humanos el mismo cuadro clínico, cuyos síntomas más frecuentes son fiebre alta, cefalea, mialgia, anorexia, dolor retroorbital y leucopenia (Bartelloni y Tesh, 1976). Este síndrome febril agudo, no fatal, de unos tres días de duración se conoce con el nombre de "Fiebre de los flebotomos" y ya había sido descrita en los tiempos

de las guerras napoleónicas dónde se produjeron casos de enfermedad febril aguda entre las tropas francesas, que probablemente se tratase de fiebre de los flebotomos. En Italia se conocía como “fiebre del Papatacci”. La relación con los flebotomos fue sugerida por Taussing en 1905. Durante la 2º Guerra Mundial se produjeron epidemias entre las tropas aliadas, y en los años 1943 y 44 se aislaron los virus Nápoles y Sicilia a partir del suero de fase aguda de soldados enfermos, que se inocularon en voluntarios sanos (Sabin y cols, 1944). Más tarde, estas cepas de VN y VS fueron adaptadas al cultivo en ratones recién nacidos mediante sucesivos pases intracerebrales (Sabin, 1955).

Posteriores aislamientos y estudios de seroprevalencia demuestran que virus Nápoles y Sicilia están distribuidos a lo largo de las costas mediterráneas europeas y norafricanas, el valle del Nilo, suroeste asiático, zonas adyacentes a los mares Caspio y Negro y Oriente Medio hasta Bangladesh. No se han hallado evidencias serológicas de circulación de estos virus en el Sudeste asiático, China o África Occidental (Tesh y cols, 1975). La distribución de estos virus se solapa con la de *P.papatacci*, su vector reconocido (Watts y cols, 1988). No se conoce el reservorio natural de estos virus, en caso de que lo tuvieran.

I.4. VIRUS TOSCANA

I.4.1. HISTORIA

El virus Toscana (vTOS) fue aislado por primera vez en 1971 durante un estudio de campo sobre la ecología de Arbovirus de *Phlebotomus perniciosus* capturados en Monte Argentario, al sur de la región italiana de Toscana (Verani y cols, 1980). Se le dio el nombre de Toscana a este nuevo virus debido a la región de Italia en la que fue aislado por primera vez y se incluyó en el serogrupo de los virus de la fiebre de los flebotomos, género Phlebovirus, familia Bunyaviridae, y se registró en el catálogo internacional de Arbovirus

(Karabatsos, 1985). Más tarde también se aisló vTOS de *P.perfiliewi* como resultado de un estudio para determinar posibles vectores de vTOS en distintas áreas de la Toscana (Verani y cols, 1988).

La neurovirulencia de vTOS se sospechó a raíz de estudios de patogenicidad en animales de laboratorio; vTOS resultaba letal en ratones recién nacidos. En 1983 se aisló vTOS por primera vez del LCR de una mujer joven con diagnóstico de meningitis linfocitaria (Leoncini y cols, 1986). A diferencia de otros virus transmitidos por flebotomos en Italia, como Nápoles o Sicilia, vTOS era capaz de producir meningitis y meningoencefalitis en humanos (Erhnst y cols, 1985; Calisher y cols, 1987; Nicoletti y cols, 1991). Se observó además que la prevalencia de anticuerpos frente a virus Toscana entre los individuos que habían sufrido meningitis en el pasado era muy alta (Francisci y cols, 2003), así como la seroprevalencia en la población general de Toscana (24,8%) (Nicoletti y cols, 1980).

El sistema utilizado para aislar el virus, o el número de pases en un determinado huésped puede modificar el comportamiento de la cepa del virus o alguna de sus propiedades biológicas. Se comparó el tamaño de placa, la cinética de replicación, presencia de actividad de autointerferencia, la eficiencia de la replicación a diferentes temperatura y virulencia para los ratones de dos cepas de virus Toscana obtenidas del mismo pool de flebotomos y aisladas y mantenidas en dos sistemas de cultivo diferentes, en cerebro de ratón y en células Vero. Al cabo de 4 a 6 pases en los distintos sistemas de cultivo algunas de estas propiedades biológicas cambian, tales como el tamaño de placas formadas, e incluso en la virulencia de la cepa sobre ratones blancos (Verani y cols, 1984).

Posteriormente se ha descrito la presencia de virus Toscana, además de en Italia, en otros países mediterráneos como España (Mendoza Montero y cols, 1998), Portugal (Ehrnts y cols, 1985), Chipre (Eitrem y cols, 1991), Argelia (Dionisio y cols, 2003) y Francia (Hemmesbach-Miller y cols, 2004).

I.4.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y ANTIGÉNICAS

Como el resto de los miembros de la familia Bunyaviridae, vTOS posee un genoma RNA de cadena sencilla y polaridad negativa dividido en tres segmentos, S (small), M (medium) y L (large), asociados numerosas copias de la Nucleoproteína (N). La nucleocápside es helicoidal, y en ella también se incluye la polimerasa (P). vTOS es un virus envuelto, en cuya cubierta se hallan las glicoproteínas G1 y G2. Los viriones tienen un diámetro de 80 a 120 nm.

El segmento S del genoma tiene 1869 nucleótidos y codifica dos proteínas mediante una estrategia "ambisense", con dos ORF (open reading frame). Por un lado, mediante un mRNA complementario al extremo 3' del RNA viral codifica la nucleoproteína (N), de 253 aminoácidos y 27 KDa de tamaño. El extremo 5' codifica para una proteína no estructural (Ns) de 316 aminoácidos y 37KDa (Giorgi y cols, 1991).

El segmento M, con 4215 nucleótidos, tiene un único ORF en el sentido complementario al viral, que codifica para una proteína precursora de 1339 aminoácidos (149 kDa) con nueve posiciones glicosiladas (Gró y cols, 1997). A partir de ella se obtienen las dos glicoproteínas G1 y G2, y una tercera proteína no estructural de 30 kDa, Nsm (Di Bonito y cols, 1997).

Por último, el segmento L de 6404 nucleótidos, contiene un único ORF, que codifica la proteína L de 2095 aminoácidos, precursora de la L polimerasa (Di Bonito y cols, 1999). El ORF se expresa a través de un RNAm complementario al viral. La región central de la proteína L de vTOS y RVF está muy conservada, observándose una homología en la secuencia de aminoácidos del 68% (Accardi y cols, 1993).

La nucleoproteína N de vTOS es altamente antigénica, siendo la mayor responsable de la respuesta inmune, tanto de IgG como de IgM e IgA (Schwarz y cols, 1996). La respuesta de anticuerpos frente a este antígeno es de larga duración y parecen ser parcialmente protectores (Cusi MG y cols, 2001). La respuesta inmune frente a las glicoproteínas G1 y G2 es más heterogénea,

detectándose sólo algunos de los pacientes infectados por vTOS (Magurano y Nicoletti, 1999; Di Bonito y cols, 2001).

Los estudios antigénicos sobre *Phlebovirus* basados en fijación de complemento (Tesh y cols, 1982) e inmunofluorescencia (Tesh y cols, 1982; Eitrem y cols, 1991b; Mendoza-Montero y cols, 1998) indicaban que vTOS estaba más relacionado antigénicamente con virus Nápoles que con virus Sicilia; y sin embargo, con técnicas de inmunoblot, la reacción cruzada de vTOS con virus Sicilia es más fuerte que con virus Nápoles (Schwarz y cols, 1996). No se han observado reacciones cruzadas, o de muy baja intensidad entre los distintos serotipos de virus de fiebre de los flebotomos con técnicas de neutralización (Tesh y cols, 1982; Eitrem y cols, 1991b).

I.4.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Como se ha comentado anteriormente, el vTOS y RVF son los únicos *Phlebovirus* con capacidad neurovirulenta. La infección por vTOS en humanos se caracteriza por cursar con fiebre alta, cefalea, vómitos, meningitis linfocitaria, generalmente de carácter benigno que se resuelve de manera espontánea, a corto o medio plazo, sin secuelas neurológicas permanentes (Nicoletti y cols, 1991; Navarro y cols, 2004). Ocasionalmente la enfermedad se presenta de una forma más virulenta, como meningoencefalitis o encefalitis sin meningitis (Dionisio y cols, 2001), en algunos casos de curso grave (Baldelli y cols, 2004).

El periodo de incubación de vTOS debe ser prolongado, ya que en la mayoría de los casos, tanto anticuerpos IgM como IgG están presentes en el suero de los pacientes en el momento del debut de los síntomas (Magurano y Nicoletti, 1999). En los casos de infección importada en turistas, la enfermedad se suele manifestar alrededor del quinto día del regreso de la zona endémica visitada (Calisher y cols, 1987; Ehrnst y cols, 1985; Schwarz y cols, 1993).

Las altas tasas de seroprevalencia entre la población de las distintas regiones donde se ha aislado el virus Toscana, junto con la baja incidencia de enfermedad neurológica apuntan hacia la posibilidad de frecuentes infecciones subclínicas o de escasa sintomatología (Braito y cols, 1997; Valassina y cols, 2003). Los principales brotes de infección neurológica por vTOS han ocurrido entre población susceptible procedente de países en los que no circula vTOS y que llega a un área endémica, como turistas (Calisher y cols, 1987; Eitrem y cols, 1991) o tropas (Eitrem y cols, 1990). Parece que la población nativa de estas zonas se ve afectada en menor medida debido a la inmunidad adquirida a lo largo de años en contacto con el virus. Las manifestaciones clínicas de la infección son más frecuentes en los adultos, aunque también ocurren en niños (Braito y cols, 1998).

I.4.4. EPIDEMIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

Phlebotomus perniciosus y *P. perfiliewi* son los vectores reconocidos de vTOS (Verani y cols, 1988).

Virus Toscana se transmite entre los flebotomos transováricamente y probablemente también por vía sexual. Ha sido aislado en repetidas ocasiones de flebotomos machos (Verani y cols, 1988) y varias experiencias in vivo lo demuestran (Tesh y cols, 1987; Tesh y cols, 1992). La transmisión transovárica es más efectiva en el segundo ciclo gonotrópico tras la infección oral de la hembra que en el primer ciclo. Esto es debido a que la ingestión de sangre infectada inicia la multiplicación vírica y estimula el desarrollo ovárico. El corion del huevo actúa como barrera para la entrada del virus. Si los huevos han alcanzado esta fase de desarrollo antes de que el virus penetre en el cuerpo de hembra, entonces los huevos permanecerán libres de virus. En el segundo ciclo ovárico, el virus y los huevos en desarrollo estarán juntos al mismo tiempo, favoreciéndose la transmisión transovárica (Maroli y cols, 1993).

Hasta el momento no se conoce reservorio vertebrado para vTOS. Sólo se ha descrito el aislamiento de vTOS en el cerebro de un murciélago de la especie *Pipistrellus khuli* (Verani y cols, 1988), aunque se sospecha que ha de existir algún ciclo de amplificación del virus, ya que, cuando se transmite verticalmente entre los flebotomos, la tasa de infección en éstos va disminuyendo en cada generación (Tesh y Modi, 1987).

Estudios serológicos realizados entre la población local de distintas áreas de Italia (Nicoletti y cols, 1980; Francisci y cols, 2003), España (Mendoza Montero y cols, 1998; Echevarría y cols, 2003) y Chipre (Eitrem y cols, 1991b) muestran una elevada prevalencia de anticuerpos frente a vTOS en estas zonas. Así mismo, la descripción de casos esporádicos de infección por vTOS en Portugal (Ehrnst y cols, 1985), Norte de África y sur de Francia (Hemmesbach-Miller y cols, 2004), indican la amplia circulación de vTOS a lo largo de la cuenca mediterránea, coincidiendo su distribución con la de sus flebotomos vectores (Abonnenc, 1972).

La infección neurológica es más frecuente durante el verano, con un pico de incidencia en el mes de agosto (Nicoletti y cols, 1991), coincidiendo con la época de máxima actividad del vector.

Las cepas de vTOS aisladas en España muestran diferencias significativas en la secuencia del fragmento L amplificada respecto a la cepa italiana de referencia ISS.Phl.3 (Sánchez Seco, M.P., 2003). Incluso las cepas de vTOS que circulan por una misma zona geográfica muestran cierta variabilidad genética, como se describe en el trabajo de Valassina y colaboradores de 1998, en el que detectan cuatro variantes circulando en la Toscana durante los veranos de 1995 a 1997. En este caso los fragmentos que comparan con la cepa de referencia pertenece al segmento S del genoma de vTOS. Esta variabilidad genética probablemente esté influida por la naturaleza RNA del genoma viral, así como al ciclo de transmisión huésped-vector (Valassina y cols, 1998).

I.4.5. DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de laboratorio de la infección por VTOS existen varios métodos: aislamiento del virus en cultivo celular de la muestra del LCR, detección del genoma del virus mediante técnicas de biología molecular y detección de anticuerpos específicos de tipo IgM frente a VTOS en el suero del paciente como indicador de infección aguda.

I.4.5.1. AISLAMIENTO EN CULTIVOS CELULARES

VTOS es capaz de infectar y producir efecto citopático (ECP) en varias líneas celulares de vertebrados como Vero, BHK-21, CV-1 entre el 2º y 4º día post-inoculación, y al cabo de 6-7 días en RD y LL-MCK. No se observa evidencia de crecimiento en cultivos celulares de *Stegomyia albopicta* o *St. aegypti* (Verani, y cols, 1984) (antes *Aedes albopictus* y *Ae. aegypti* (Reinert y cols, 2004)). También se puede aislar vTOS en ratones inoculados intracerebralmente. En la mayoría de los laboratorios se utiliza la línea celular Vero para aislamiento de vTOS.

Tras detección de ECP, se identifica el virus fundamentalmente por pruebas físico-químicas, pruebas de neutralización de placas de ECP e inmunofluorescencia con antisueros específicos. Recientemente se han incorporado las técnicas de biología molecular para identificación de aislados (Schwarz y cols, 1995; Valassina y cols, 1996; Sánchez Seco y cols, 2003).

VTOS es sensible a la acción de los disolventes lipídicos tales como el cloroformo o el dietil éter, así como al pH ácido. La actividad de las hemaglutininas de las glicoproteínas de la envuelta se manifiesta con hematíes de ganso. Los estudios de termoestabilidad muestran que el virus se mantiene estable a 4°C durante al menos una semana, aunque a temperaturas superiores se inactiva con mayor facilidad.

Antigénicamente está muy relacionado con el virus Nápoles. Ambos virus, además de presentar diferencias biológicas, presentan diferencias serológicas mediante el test de neutralización de reducción de placa. Existe un alto grado de reactividad cruzada con pruebas como fijación de complemento e inmunofluorescencia. (Verani y cols, 1984). El tratamiento con dimetilsulfóxido (DMSO) no afecta al tamaño de las placas que produce vTOS, a diferencia de lo que ocurre con virus Nápoles que con la adición de DMSO aumenta tanto el tamaño como el número de placas formadas.(Verani y cols, 1984).

I.4.5.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Distintos autores han demostrado la utilidad de las técnicas de amplificación molecular para el diagnóstico directo en LCR de la infección por VTOS, en muchos casos con resultados superiores al cultivo.

La técnica más usada en la actualidad es la RT-nested-PCR, que ha mostrado ser una técnica sensible y específica para el diagnóstico de infección neurológica por VTOS. Existen diferentes estrategias de amplificación descritas, RT-PCR nested, multiplex o genéricas. En 1995, Schwarz y colaboradores describieron un método de RT-nested-PCR específica para vTOS, con cebadores dirigidos hacia el segmento S, que mostró ser sensible y específica. Basándose en el mismo principio, Valassina y colaboradores diseñaron otra RT-PCR nested, en el que la diana también era un fragmento del segmento S del vTOS, que fue capaz de detectar RNA de vTOS en el LCR de 13 pacientes con meningitis, en los que hubo sólo tres aislamientos en cultivo celular y 9 IgM positivas en suero, mostrando, por tanto, una gran sensibilidad (Valassina y cols, 1996). Sin embargo, esta misma PCR aplicada 11 cepas de vTOS aisladas en España no consiguió amplificar RNA de ninguna de ellas (Sánchez Seco y cols, 2003). Por ello, se diseñó otra técnica RT-nested-PCR genérica, que fuese capaz de amplificar el genoma de cualquier *Phlebovirus*, usando como cebadores oligonucleótidos degenerados cuya diana es un fragmento conservado en todo el género del segmento L. Posteriormente se secuencian el fragmento amplificado para identificar a qué virus pertenece. Con esta técnica tanto las cepas españolas como de las italiana son amplificadas (Sanchez Seco y cols, 2003). Otra estrategia muy interesante es

la PCR múltiple que permite detectar de manera simultánea varios virus distintos. Consiste en mezclar cebadores dirigidos a virus de distintas especies en un mismo tubo de reacción, y que rinden fragmentos de amplificación de distinto tamaño de manera que puedan distinguirse al revelar la PCR mediante electroforesis en gel. Las ventajas de este método son varias, sobre todo cuando la muestra es escasa, como suele ocurrir con los LCRs, y la batería de posibles patógenos es amplia, ya que supone ahorrar en costes de reactivos, material fungible, tiempo de procesamiento y cantidad de muestra utilizada. Además, el resultado se obtiene con mayor rapidez, mejorando el manejo del paciente al contar de manera precoz con información acerca de la etiología de la enfermedad. Un ejemplo de este tipo de técnica es la duplex RT-nested-PCR para enterovirus y virus Toscana (Valassina y cols, 2002).

Es muy importante que la muestra de LCR sea tomada pronto tras el comienzo de los síntomas ya que al cabo de una semana tras el debut de la enfermedad la PCR puede negativizarse (Valassina M, 1996).

I.4.5.3. DIÁGNÓSTICO SEROLÓGICO

El diagnóstico de infección aguda se basa en la detección de IgM específicas fundamentalmente en suero, aunque también puede utilizarse en LCR. Dichas inmunoglobulinas están presentes en suero desde el tercer día del inicio de los síntomas y permanecen entre 3-6 semanas.

Para estudios de seroprevalencia se utilizan técnicas de detección de IgG, que permanecen positivas tras varios años de sufrida la primoinfección. La IgG también suele ser positiva al poco tiempo del inicio de los síntomas, y muchas veces ya es detectable en el suero de fase aguda en el momento de la toma de muestra, no pudiendo valorarse la seroconversión.

Tanto para detectar IgG como IgM existen pruebas inmunoenzimáticas comerciales. Las técnicas inmunoenzimáticas, que usan como antígeno nucleoproteína de vTOS recombinante, son las más usadas actualmente debido a su demostrada sensibilidad y especificidad (Soldateschi y cols, 1999;

Ciufolini y cols, 1999). También se han utilizado como antígeno extractos de cultivos de vTOS en cerebro de ratón (Braito y cols, 1997), aunque hoy en día se ha impuesto en uso del antígeno recombinante N, por su mayor facilidad de obtención y composición estandarizada, lo que permite la producción de kits comerciales.

La detección de anticuerpos específicos frente a vTOS también se puede realizar mediante inmunoblot, usando como antígeno un lisado de cultivo de vTOS en células Vero (Schwarz y cols, 1996). Sin embargo con esta técnica, como se ha comentado anteriormente, existe la posibilidad de reacciones cruzadas con virus Nápoles y Sicilia.

Clásicamente se han utilizado para diagnóstico serológico la fijación de complemento, inmunofluorescencia y técnicas de neutralización de reducción de formación de placa, inhibición del ECP o inhibición de la hemaglutinación. Además de tratarse de pruebas mucho más laboriosas y costosas que las EIA, la fijación de complemento, inhibición de la hemaglutinación e inmunofluorescencia han mostrado poca especificidad a la hora de distinguir entre los virus de serogrupo de la fiebre de los flebotomos, produciéndose reacciones cruzadas importantes entre vTOS, Nápoles, Sicilia, Tehran (Tesh y cols, 1982).

La prueba de neutralización de reducción de placa es mucho más específica que las anteriores (Tesh y cols, 1982), aunque tremendamente laboriosa, y no todos los laboratorios de microbiología tendrían capacidad para aplicarla de manera rutinaria en el diagnóstico de infecciones por vTOS.

Puede haber reacciones cruzadas con otros *Phlebovirus* serológicamente relacionados como virus Sicilia, RVF, pero sobre todo con virus Nápoles que es antigénicamente muy parecido a vTOS.

I.4.6. SITUACIÓN ACTUAL DEL CONOCIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS TOSCANA EN ESPAÑA

Desde 1988 en que se detectaron los primeros casos de infección por vTOS hasta la fecha se han descrito casos, diagnosticados por diferentes procedimientos en la provincia de Granada, Madrid y Almería. Todos los casos corresponden a pacientes con meningitis linfocitaria (Mendoza-Montero y cols, 1998; Navarro y cols, 2004; Echevarría y cols, 2003). No obstante, la importancia real de vTOS como agente de meningitis linfocitaria en nuestro medio es en gran medida desconocida

Algunos estudios indican una alta seroprevalencia de infección por vTOS en distintas regiones españolas, aunque las muestras han sido pequeñas y los procedimientos diagnósticos poco estandarizados (Mendoza-Montero y cols, 1998).

En la secuenciación de distintos fragmentos del genoma de algunas cepas de vTOS aisladas en Granada se observan diferencias en nucleótidos de entre el 15 y el 19 %, según la región analizada, con respecto a las cepas aisladas en Italia, lo que apoyaría la existencia de una variante española de vTOS, circunstancia a tener en cuenta en el diseño de cebadores genéricos para el diagnóstico molecular de la infección por vTOS en nuestro medio (Sánchez-Seco y cols, 2003).

En la actualidad ignoramos cuál es en la Península Ibérica el vector fundamental, así como si existe algún reservorio vertebrado de vTOS.

Desde Junio de 2003, se ha creado en España la Red Temática de investigación Cooperativa para el Estudio de las Enfermedades Víricas Transmitidas por Artrópodos y Roedores (Red EVITAR), financiada por el Fondo de Investigaciones Sanitarias, uno de cuyos subproyectos es la investigación por vTOS en las provincias de Granada y Madrid. Las actividades desarrolladas en dicho subproyecto y los resultados fundamentales obtenidos hasta la fecha constituyen la base de este trabajo presentado como Tesis Doctoral.

I.5. FLEBOTOMOS

I.5.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Phylum: Arthropodo, clase: Insecta, orden: Díptera, suborden: Nematóceros, familia: *Psychodidae*, subfamilia: *Phlebotominae*.

Los flebotomos son dípteros nematóceros pertenecientes a la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae*, habiéndose descrito actualmente alrededor de 700 especies.

La familia *Psychodidae* se divide en tres subfamilias según la clasificación propuesta por Fairchild (1955), *Psychodinae*, *Trichomyiinae* y *Phlebotominae*.

El número de géneros y subgéneros varía según los autores (Theodor, 1948) (Lewis y col, 1977), (Artemiev, 1991). En nuestro país se conocen 2 géneros y 11 especies (Gil Collado y cols, 1989) que se muestran en la Tabla 3.

GÉNERO	SUBGÉNERO	ESPECIE
<i>Phlebotomus</i>	<i>Larrousius</i>	<i>P. perniciosus</i> <i>P. longicuspis</i> <i>P. ariasi</i>
	<i>Adlerius</i>	<i>P. mascitii</i>
	<i>Paraphlebotomus</i>	<i>P. sergenti</i> <i>P. alexandri</i> <i>P. chabaudi</i>
	<i>Phlebotomus</i>	<i>P. papatasi</i>
	<i>Abonnencius</i>	<i>P. fortunatarum</i>
	<i>Sergentomyia</i>	<i>Sergentomyia</i>

Tabla 3: Especies de flebotomos presentes en España. Clasificación por géneros y subgéneros

En la actualidad los avances en la sistemática de los flebotomos están basados en análisis bioquímicos de isoenzimas, de carbohidratos cuticulares, y análisis de ADN.

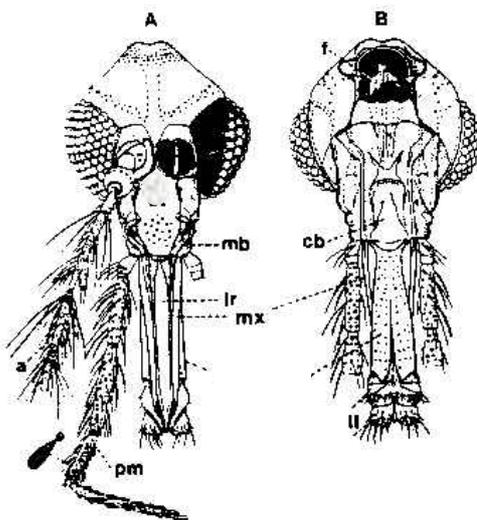
I.5.2. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DIFERENCIALES DE LOS FLEBOTOMOS ADULTOS

Los flebotomos adultos se caracterizan por su pequeño tamaño, de 1 a 5 mm. El cuerpo es piloso, con el tórax convexo. Las alas son lanceoladas, cubiertas de largos pelos, con nervadura central y ramificaciones. En reposo, las alas forman un ángulo de 45° con el cuerpo. Las hembras poseen aparato picador chupador que les permite obtener sangre de hospedadores vertebrados, necesaria para madurar sus folículos ováricos.

Externamente se dividen en tres partes: cabeza, tórax y abdomen

I.5.2.1. CABEZA

La cabeza tiene una cubierta quitinosa, poseen dos ojos laterales, dos antenas formadas por 16 segmentos, y dos palpos.



El aparato chupador-picador, el labro epifaríngeo, contiene las dos mandíbulas (sólo en las hembras), dos maxilas, la epifaringe (canal de alimentación), la hipofaringe (canal salivar). Interiormente, la epifaringe está conectada al cibarium, que actúa como una bomba succionadora, unida a la faringe.

Figura 4. Esquema de la cabeza de flebotomos. A: vista frontal. B: vista ventral. mb: mandíbula, lr:labro-epifaringe, mx: maxila, f: faringe, cb: cibarium, a: antena, pm: palpo.

I.5.2.2. TÓRAX

El tórax está bien desarrollado y se divide en protórax, mesotórax y metatórax. En él se insertan los tres pares de patas, las alas y un par de pequeñas alas modificadas que actúan como balancines durante el vuelo y se conocen como alterios.

Las alas son lanceoladas y están surcadas por varias nervaduras longitudinales y algunas transversales (Figura 5). La posición relativa de los puntos de inserción de estas nervaduras se utiliza para la clasificación en géneros y subgéneros (Léger y Depaquit, 1999).

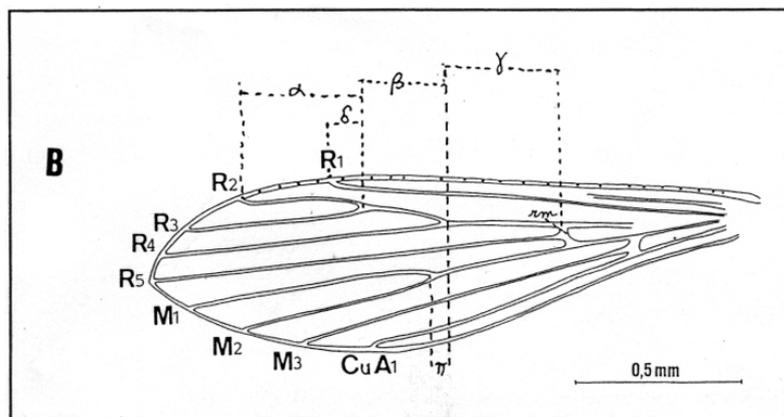


Figura 5. Esquema de ala de flebotomo y sus nervaduras

I.5.2.3. ABDOMEN

El abdomen está compuesto por diez segmentos, los tres últimos transformados en segmentos genitales. Cada segmento está recubierto por unas placas quitinosas dorsales que se unen mediante unas zonas membranosas, capaces de dilatarse cuando se alimenta el insecto.

En el abdomen de las hembras se encuentran: las valvas hipoginiales o gonapofisis ventrales, la vagina, el ano y la cerca.

El aparato genital interno está formado por:

- dos ovarios cuyo tamaño varía con el estado de desarrollo de los huevos
- dos glándulas anexas en forma de saco

- dos espermatecas, cápsulas quitinosas de aspecto variable, muy útiles en la identificación de especies. Las espermatecas constan de un conducto espermático, unido a un cuerpo anillado que termina en una cabeza sésil o pedunculada.

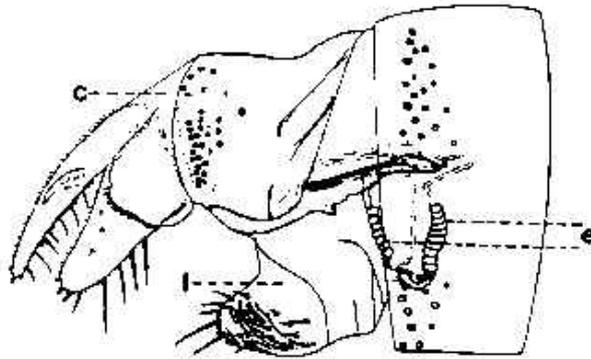


Figura 6. Aparato genital femenino. c: cerca, i: valvas hipogyniales, e: espermatecas

Los machos tienen los segmentos 7º y 8º reducidos y los 9º y 10º totalmente modificados para formar la genitalia. Se distinguen desde la parte dorsal a la ventral:

- dos apéndices articulados voluminosos con un artículo basal, el coxito, y un artículo apical, el estilo
- dos apéndices que salen de la base del coxito, los parámetros
- dos prolongaciones ventrales, los lóbulos laterales
- dos aedeagus, penes o valvas peneanas que salen entre los parámetros. Éste está conectado a un conducto, el filamento peneano que lo une a la bomba genital y el pistón. A su vez, la bomba está conectada con los testículos mediante los canales deferentes.
- las cercas

La morfología y ornamentación de la armadura genital externa de los machos es fundamental en la clasificación taxonómica (Léger y Depaquit, 1999).

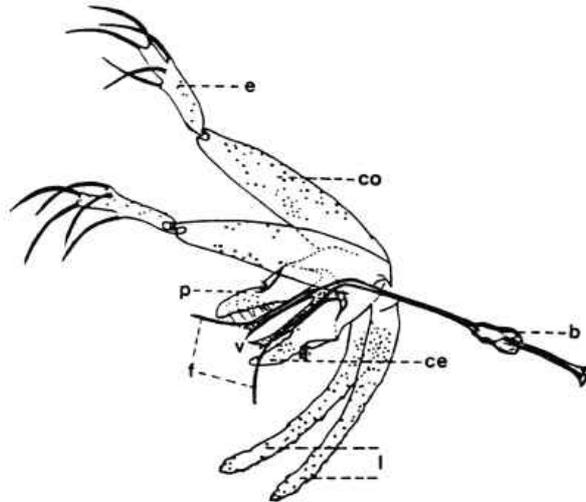


Figura 7. Genitalia de machos de flebotomos. e: estilo, co: coxito, p: parámero, v:valvas peneanas, f: filamentos genitales, ce: cerca, l: lóbulos basales, b: bomba genital

I.5.3. CICLO VITAL

Los flebotomos presentan cuatro fases de desarrollo: huevo, larva, pupa o ninfa y adulto o imago (Figura 8).

Los huevos son ovales, con la cara dorsal convexa, de tamaño 300-400 μm por 100-150 μm , de color blanquecino en el momento de la puesta, que luego va oscureciéndose con el tiempo, y con un dibujo en la cubierta externa que varía de una especie a otra (Léger y Depaquit, 1999). La puesta se realiza sobre un sustrato sólido y el número de huevos por puesta oscila entre 30-80. El sustrato sólido suelen ser desperdicios orgánicos, restos vegetales, etc, que contengan una humedad adecuada. Aunque los huevos no suelen ser puesto en el agua, conservan su viabilidad sumergidos a 18°C hasta cinco días. Sin embargo, la desecación y la acción directa de los rayos solares resultan fatales. La temperatura es un factor determinante en el desarrollo embrionario de los huevos, que con la humedad adecuada, y una temperatura óptima de 26 a 30°C, eclosionan a los 6 ó 7 días.

Las larvas al salir del huevo miden unos 0,5-1mm, son de color blanco-amarillento, y sólo tiene quitinizado la cabeza y el último segmento abdominal. Con el tiempo van aumentando el tamaño y la quitinización, hasta que llegan a ser casi negras (Léger y Depaquit, 1999). Las larvas pasan su vida en el sustrato sólido, suficientemente húmedo, alimentándose de restos orgánicos de origen animal, excrementos, restos vegetales en descomposición, etc.

En el estado de larva se producen tres mudas (cuatro estadios larvarios). El paso de una muda a otra está influenciado por la temperatura, siendo de 17-21 días a 30°C para *P.papatasi* (Theodor, 1934).

En los países de clima templado con estación invernal, el 4º estadio larvario permanecería en diapausa durante el invierno. El comienzo de la hibernación estaría determinado tanto por factores ambientales como la bajada de temperatura (Theodor, 1934), (Theodor, 1935) o la falta de humedad y factores cíclicos de carácter hereditario (Dolmatova y Demina, 1971). Según las especies, la diapausa puede ocurrir durante otros estadios larvarios e incluso en la fase de huevo (Trouillet, 1981).

La pupa aparece cuando el 4º estadio larvario migra a la parte superior del sustrato en el que vive, donde permanece inmóvil durante algún tiempo con la parte anterior del cuerpo levantada. Tras la rotura dorsal de la cutícula, sale la pupa que queda unida al sustrato por los segmentos posteriores. La pupa mide unos 3mm; al principio es de color amarillento que va tornándose oscura con el paso del tiempo. Empiezan a desarrollarse en su interior diversas partes del adulto; la cabeza está fusionada al tórax, se aprecian las antenas, palpos, ojos y piezas bucales. Se puede calcular la edad por el color de los ojos: transparentes, marrón, y justo antes de la eclosión del imago, negros. (Léger y Depaquit, 1999). En el tórax se distinguen tres segmentos de los que parten las alas y patas, y en el abdomen 9.

Finalmente se produce la eclosión del adulto, tras la cual permanece unas horas en reposo (5-24h).

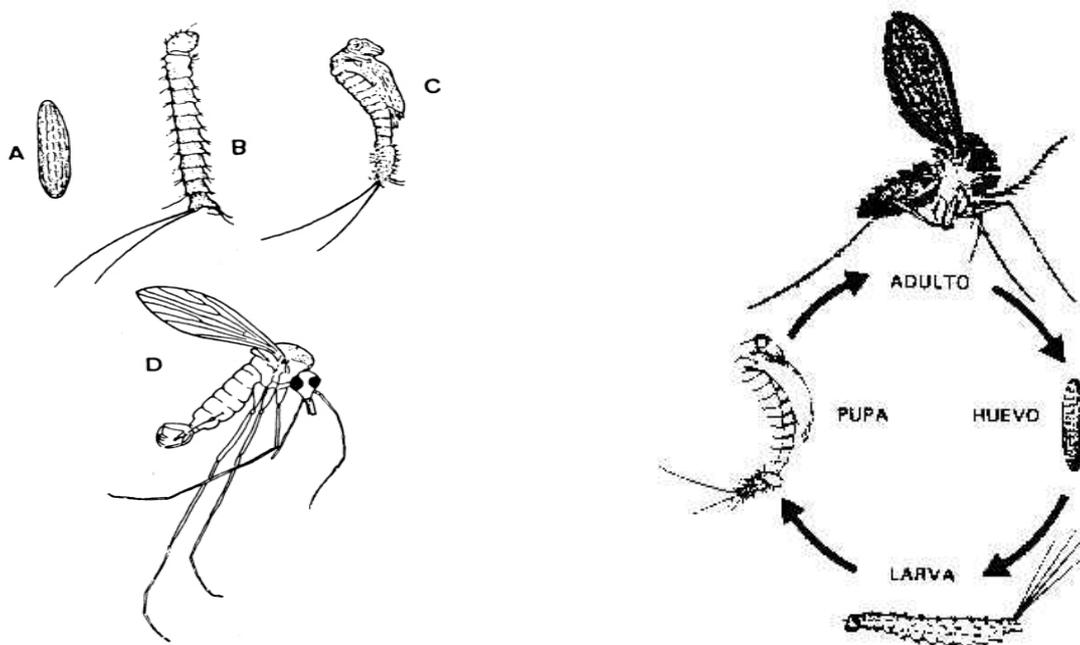


Figura 8. Ciclo vital de los flebotomos. A:huevo; B:larva; C:pupa; D:adulto

La duración total del ciclo, desde la oviposición hasta la eclosión del adulto ha sido estudiada por varios autores para varias especies y condiciones. Entre unos 30-37 para *P.papatasi* a 30°C (Theodor, 1934); unos 40 días en el caso de *L. longipalpis* mantenida a 25°C (Killick-Kendrick y cols, 1977); hasta los 134-216 días descritos para *P.perniciosus* a una temperatura de 22 a 24°C (Parrot y cols, 1933) o los 40-197 días para *P.papatasi* cuando la temperatura varía de 28 a 22°C (Parrot, 1931).

Las hembras adultas suelen vivir de dos semanas a dos meses. Los machos tienen una vida algo más corta (Léger y Depaquit, 1999).

I.5.4. ECOLOGÍA, HÁBITOS Y FENOLOGÍA

Los flebotomos están ampliamente distribuidos por el mundo. En el Viejo Mundo, se les encuentra entre los 45° latitud Norte y 40° latitud Sur. En América, *Lutzomyia* se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta el

Norte de Argentina. Dentro de estos límites, la abundancia de especies y las poblaciones varían con la altitud. Cada región posee su propia fauna de flebotomos; así hay flebotomos de áreas boscosas, tropicales, de desiertos, etc. Incluso dentro de una misma región, existen microecosistemas, en los que unas especies predominan sobre otras.

Las fluctuaciones que sufren las poblaciones de flebotomos a lo largo del año varían según las zonas climáticas. En las áreas tropicales no existe diapausa y la actividad de los flebotomos permanece estable a lo largo de todo el año. En las regiones templadas con estaciones invernales, la diapausa se produce en esta época. Existe cierto porcentaje de larvas en diapausa en cada generación, porcentaje que aumenta conforme avanza la temporada; mínimo en primavera, y la mayoría de las larvas en otoño. El desarrollo asincrónico de las larvas de una misma puesta obedece a causas desconocidas. Se puede provocar la diapausa de las larvas de forma artificial enfriándolas a 1-12°C durante dos semanas. (Léger y Depaquit, 1999)

El número anual de generaciones depende de la duración de la época cálida; mientras más larga sea, mayor número de generaciones. En nuestra zona Mediterránea, suele ser de una a tres generaciones por año, dependiendo de la latitud. En general, en nuestra área, los flebotomos circulan desde mayo hasta octubre. La actividad máxima también varía en función de la especie. Así, en el sur de España las poblaciones de flebotomos presentan una curva bifásica, con dos máximos, uno a principio del verano (*P. perniciosus* y *P. papatasi*) o final de primavera (*P. ariasi*) y otro al final del verano, principio de otoño (*P. perniciosus* y *P. papatasi*) u otoño (*P. ariasi*) (Morillas Márquez y cols, 1983), (Sanchís Marín y cols, 1986).

Los flebotomos son insectos de hábitos nocturnos. Comienzan su actividad a partir de la puesta de sol, al anochecer, y es cuando realizan sus comidas de sangre o líquidos azucarados, o el acoplamiento. Regresan a sus lugares de reposo de madrugada, antes del amanecer. Los lugares de reposo suelen ser sitios protegidos del exceso de luz y del viento, que les proporcionan la temperatura y humedad relativa adecuadas (huecos en troncos de árboles,

grietas en muros, madrigueras, cobertizos, establos, gallineros, viviendas humanas...). Durante el día los flebotomos permanecen en reposo en estos refugios (Gil Collado y cols, 1989).

Para que la actividad de los flebotomos tenga lugar es necesario que las condiciones climáticas sean propicias en cuanto a temperatura, humedad y viento. La velocidad del viento ha de ser menor de 3-4 m/sg (Dolmatova y Demina, 1971). A una temperatura menor de 17°C y brisa superior a 2 m/sg la actividad de los flebotomos desciende mucho. La actividad máxima en la especie *P. ariasi* ocurre una hora después de la puesta de sol, hacia las 22h, con una temperatura de 22°C y humedad relativa del 48%. La llegada de una tormenta, bajada de temperaturas o aparición de viento detiene la actividad de los adultos (Rioux y Golván, 1969).

Algunas especies se ven atraídas por una luminosidad suave.

Su capacidad de vuelo es limitada. Suelen desplazarse en vuelos cortos, o a saltitos. La distancia habitual en la que se mueven son unos 200 m. Sin embargo, en ausencia de un hospedador adecuado sobre el que alimentarse pueden llegar a recorrer hasta 1 ó 2 km (Gil Collado y cols, 1989).

En cuanto a los hábitos alimenticios, los flebotomos se nutren con líquidos azucarados, con fructosa, sacarosa, etc. Sólo las hembras son hematófagas, necesitando alimentarse con sangre para la maduración de los huevos. Hay especies que tienen predilección por la sangre de ciertos hospedadores y otras pican al vertebrado que tengan más disponible ya sea por su número, tamaño, o cercanía (Colmenares y cols, 1995; Bongiorno y cols, 2003; Svobodová y cols, 2003). Una vez alimentadas, las hembras regresan a sus refugios para digerir y filtrar la sangre antes de buscar el lugar donde se realizará la puesta que ocurre unos de 3 a 10 días después de la ingesta de sangre, según la temperatura exterior (a menor temperatura mayor tiempo de digestión y maduración de los huevos). La mayoría de las hembras jóvenes comienzan a picar a los 2 a 10 días tras la eclosión, ya sea antes o después de copular con el macho (Léger y Depaquit, 1999).

I.5.5. IMPORTANCIA SANITARIA EN HUMANOS

Los flebotomos son vectores y muchas veces reservorio de numerosas enfermedades de importancia médica y veterinaria, como infecciones por parásitos (*Leishmania spp*) (Bruckner y Labarca, 2003), bacterias (*Bartonella bacilliforme*) (Welch y Slater, 2003), y virus (Arbovirus).

En cuanto a los virus que son capaces de transmitir son muy numerosos. La mayoría de ellos pertenecen al género *Phlebovirus*. Cada región tiene sus propios *Phlebovirus*, vectorizados por especies propias de flebotomos, sin que se conozcan en muchos casos reservorios vertebrados (Tsai y Chandler, 2003).

I.5.5.1. PAPEL COMO VECTOR DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN ANIMALES Y HUMANOS

La adaptación de los flebotomos al medio ecológico en el que viven los vertebrados de los que se van a alimentar, será la pieza clave para que exista la transmisión de las enfermedades a los mismos. El riesgo epidémico o epizootico para una determinada infección en una zona dada va a depender de varios factores, directamente relacionados con el reservorio, con el vector y con el huésped; u otros factores de carácter secundario estarán relacionados la biología y la ecología del lugar.

La densidad de la población de flebotomos, así como la proporción de éstos que portan el agente infeccioso aumentan el riesgo epidemiológico, ya que frecuencia media de picaduras aumenta, y por tanto la posibilidad de adquirir la infección también lo será. Por otro lado, cuanto mayor sea la expectativa de vida del flebotomo las posibilidades de que pueda infectarse aumentan. La duración va a depender tanto de la especie de flebotomo como de las condiciones climáticas (principalmente temperatura y humedad relativa) de la zona y la temporada. Estas condiciones también pueden afectar a la

metaciclo. La duración y tipo del ciclo gonotrófico también van a afectar a la epidemiología, ya que una vez infectado el insecto es capaz de transmitir el germen en cada una de las ingestas de sangre que realice. Hay especies que sólo hacen una ingesta por cada oviposición (ciclos concordantes) y otros, como *P.papatasi* que han de picar cada dos días (ciclos discordantes). Otros aspectos a tener en cuenta serían la duración del ciclo del agente infeccioso en el insecto y los hábitos de la especie (zoofilia o antropofilia, hábitos intra o extradomiciliarios, fototropismo, etc).

Por otro lado, la densidad de población del reservorio, alta enzootia, cronificación de la infección y viremia/parasitemia elevada, así como la proximidad entre reservorio, vector y humano hacen que el riesgo de infección sea mayor.

En cuanto a factores dependientes del huésped humano que aumenten el riesgo epidemiológico se cuentan la mayor o menor resistencia a la infección, la gravedad de las manifestaciones clínicas, o la proximidad del humano al hábitat del vector por hábitos de la población como aficiones, viajes, profesiones de riesgo (agrícolas, ganaderas, forestales, etc).

Otros factores que influyen en la epidemiología de una enfermedad transmitida por flebotomos son: factores biológicos (tipo de vegetación, climatología), factores ecológicos (presión con insecticidas, roturación de nuevas áreas para viviendas o cultivo), movimientos de poblaciones por turismo, operaciones militares, éxodos, etc. La llegada a una zona de una población susceptible al agente infeccioso y que nunca ha tenido contacto con él, hace que este grupo sea especialmente vulnerable.

I.5.5.2. PAPEL COMO RESERVORIO: TRANSMISIÓN SEXUAL Y VERTICAL DE VIRUS PATÓGENOS

Los virus transmitidos por flebotomos a vertebrados comparten la característica de producir viremias de bajo título en los animales o humanos infectados. Esto

sugiere que los vertebrados serían líneas finales para la mayoría de los *Phlebovirus*, y que el mecanismo para mantener estos virus debe ser distinto del típico ciclo vertebrado-insecto. El ciclo por tanto, debe completarse de alguna manera insecto-insecto. (Tesh y Chaniotis, 1975).

Uno de los aspectos más importantes y probablemente poco entendidos acerca de la ecología de estos arbovirus es cómo estos agentes se mantienen en la naturaleza durante el invierno en las regiones templadas y largas épocas secas en los trópicos, cuando los flebotomos adultos que actúan como vectores están inactivos.

Algunos de los mecanismos propuestos son:

- Reintroducción anual de virus a través de vertebrados migratorios.
- Persistencia local del virus en el vector en fase de diapausa o en vertebrados en hibernación.
- Infección crónica latente en vertebrados con viremia recurrente
- Transmisión vertical (transovárica) del virus en el vector
- Infección natural del virus a través de plantas o parásitos que son ingeridos por el vertebrado o por el insecto.

La transmisión transovárica de arbovirus en flebotomos se ha sospechado ya que en repetidas ocasiones se han aislado o detectado virus en flebotomos machos (Verani y cols, 1988). Tesh y Modi en 1987, consiguieron transmitir experimentalmente virus Toscana en trece generaciones consecutivas de *P.perniciosus* a lo largo de 23 meses sin que se apreciaran cambios biológicos en el virus tras los sucesivos pases. Las hembras infectadas transováricamente fueron capaces de transmitir el agente infeccioso mediante picadura a animales susceptibles. La infección crónica de *P.perniciosus* con vTOS no afectó a la tasa de eclosión de los insectos. Cuando se hacen emparejamientos aleatorios, la tasa de infección por vTOS en las siguientes generaciones va disminuyendo, lo que sugiere que vTOS no puede mantenerse en la naturaleza entre la población de flebotomos exclusivamente mediante transmisión transovárica (Tesh y Modi, 1987).

El virus Toscana sobrevive el invierno en áreas endémicas manteniéndose en larvas en diapausa de *P.perniciosus* (Tesh y cols, 1992). En este mismo

trabajo, Tesh logra demostrar la transmisión venérea de vTOS entre *P. perniciosus* machos infectados y hembras vírgenes. Aunque la tasa de transmisión que se observa es baja (4,5%) este podría ser uno de los mecanismos mediante los cuales se amplifica la infección vírica entre la población de flebotomos, junto con los típicos ciclos vertebrado-insecto-vertebrado, y otros mecanismos hasta ahora desconocidos.

I.5.6. DETECCIÓN DE VIRUS A PARTIR DE FLEBOTOMOS

I.5.6.1. CAPTURA

Existen diversos métodos de captura de flebotomos. La elección de uno de ellos depende del propósito del estudio a realizar con los insectos capturados.

Los métodos más utilizados son:

- Por aspiración, en los lugares de reposo de los flebotomos, con ayuda de un tubo conectado a un pequeño aspirador, o directamente aspirando con la boca. Estas capturas se realizan durante el día, hasta el anochecer, justo antes de la salida de los flebotomos. Los insectos se recuperan vivos.
- Papeles adhesivos colocados en la entrada de sus lugares de reposo, como grietas, huecos en los árboles, etc. Generalmente se usan papeles impregnados en aceite de ricino, que es viscoso, no ahuyenta a los flebotomos, es soluble en etanol 96° y permite recuperar fácilmente los individuos capturados con ayuda de un pincelito humedecido en alcohol. Los papeles pueden dejarse durante varios días en las localizaciones de captura. Este método es muy útil para estudios faunísticos.
- Trampas luminosas CDC. Son las más utilizadas por su sencillez de uso y versatilidad. Constan de un cilindro de metacrilato que porta una bombillita y un pequeño aspirador, conectados a una batería. Esta pieza se acopla a una trampa de tul de malla espesa en la que van siendo

aspirados los insectos atraídos por la luz. Las trampas se colocan al atardecer y se recogen al amanecer. Los flebotomos se capturan vivos.

El poder atrayente de la luz también se puede combinar con los otros métodos, situando los papeles adhesivos o los tubos aspiradores delante de lamparillas.

I.5.6.2.CULTIVO DE VIRUS

Una de las formas de detección de nuevos virus o variantes es mediante el cultivo a partir de los vectores sospechosos. El aislamiento de virus a partir de muestras de artrópodos se puede realizar por inoculación en animales de experimentación, o por cultivo en líneas celulares. Éste último resulta más cómodo y rentable que el primero, por lo que actualmente es mucho más utilizado.

Las líneas celulares empleadas varían en función del virus que se busque, eligiéndose aquellas en las que nuestro virus tenga un desarrollo óptimo y produzca ECP detectable. Estos cultivos celulares pueden ser de vertebrados (Vero, BHK, etc) o de artrópodos (Aedes, etc.)

I.5.6.3. DETECCIÓN DEL GENOMA VIRAL

Actualmente las técnicas de biología molecular de amplificación de ácidos nucleicos se están aplicando en la vigilancia epidemiológica de arbovirosis, para detectar los virus que están circulando entre los vectores.

Los arbovirus son virus RNA, con lo que las técnicas de PCR llevan un paso previo de retrotranscripción del RNA viral a DNA complementario (cDNA). Se han diseñado diversas estrategias en función de la finalidad del estudio. Existen PCR específicas, diseñadas para detectar una especie vírica concreta, por ejemplo West Nile, cuyos cebadores tienen como diana un fragmento conservado del genoma de esa especie.

Las PCR genéricas, con cebadores degenerados que puedan reconocer fragmentos del genoma de un género determinado, se han aplicado también en estos estudios de vigilancia. Con estas técnicas se consiguen detectar los distintos virus de un género que circulan entre los vectores, en nuestro caso flebotomos, de una región determinada (Sánchez Seco y cols, 2003). Las PCR genéricas permiten detectar nuevos virus, cuyas secuencias presentan cierta homología con algunos de los virus conocidos.

Otra estrategia muy útil, es la PCR múltiple, en la que en un mismo tubo se mezclan varias parejas de cebadores dirigidos frente a distintos virus, de manera que los fragmentos amplificados para cada uno de ellos son de distinto tamaño y se pueden distinguir fácilmente al revelar mediante electroforesis en gel, de que género era el virus presente en la muestra. Una posterior secuenciación del fragmento amplificado y comparación con otras secuencias conocidas permite identificar de qué virus se trata.

Las técnicas de biología molecular han demostrado ser más sensibles que los cultivos de virus, son rápidas y específicas. Sin embargo, el aislamiento de virus en líneas celulares sigue siendo útil e interesante, ya que permite realizar estudios de caracterización biológica, antigénica, molecular y genética de cepas de nuevos virus que hayan sido detectados.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1.- Estudio de seroprevalencia de infección por virus Toscana en la población general de la provincia de Granada.

2.- Evaluar la implicación real de virus Toscana en enfermos con cuadros neurológicos ingresados en Hospitales de la provincia de Granada.

3.-Determinar el vector de la infección por virus Toscana en la provincia de Granada

4.- Caracterización filogenética de virus Toscana aislados en provincia de Granada

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA

III.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Para el cálculo del tamaño de la muestra estimamos una seroprevalencia frente a vTOS del 10%, según datos de estudios anteriores (Mendoza-Montero y col 1998). En este caso, para estimar la proporción poblacional con un 95% de confianza y 5% de precisión necesitaríamos un mínimo de 139 individuos.

En razón a la procedencia de los sueros, para determinar posibles diferencias en la seroprevalencia de infección por vTOS atendiendo al hábitat, se establecieron 5 áreas geográficas diferentes: Granada capital, área metropolitana, sur, oeste/suroeste, y norte/noreste (Figura 9)



Figura 9. Áreas geográficas de la provincia de Granada establecidas para estudio de seroprevalencia de virus Toscana

El número de sueros incluidos en cada grupo se calculó de acuerdo con los datos demográficos y censales de la provincia de Granada, de manera que la

muestra fuese representativa de la población de toda la provincia (tabla 4) de acuerdo a los datos procedentes del Instituto Nacional de Estadística y del Instituto de Estadística de Andalucía. (Cifras de población referidas al 1 de enero de 2002)

Tabla 4. Población de la provincia de Granada a 1 de enero de 2002

ÁREA	TOTAL		VARONES		MUJERES	
	n	%	n	%	n	%
Capital	240.522	29	111.774	46	128.748	54
Metropolitana	227.994	28	114.836	50	113.158	50
Sur*	157.803	19	78.871	50	78.932	50
Oeste/Suroeste	70.397	9	35.429	50	34.968	50
Norte/Noreste	128.299	16	64.214	50	64.085	50
Población total	825.015	101	405.124	49	419.891	51

* Sur: Costa y Alpujarras

La recogida de sueros se inició en septiembre de 2003 y concluyó en diciembre de 2003. Los sueros se clasificaron por edad, sexo y área geográfica de procedencia, se separaron en tres alícuotas y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

Los sueros del grupo de edad comprendido entre los 18 a los 65 años se obtuvieron de donantes de sangre anónimos, de los que únicamente se registró la edad, sexo y área de procedencia de la donación. Los sueros de los menores de 18 años y mayores de 65 proceden de sueros anónimos de los laboratorios de Microbiología y Análisis Clínico de los Hospitales Virgen de las Nieves de Granada y Santa Ana de Motril de pacientes a los que se les solicitó analítica por procesos no infecciosos.

III.1.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS IgG FRENTE A VIRUS TOSCANA

Para determinar la seroprevalencia frente a virus Toscana la detección de IgG específica se realizó mediante una técnica inmunoenzimática, EIA Enzywell Toscana Virus IgG, DIESSE (Italia). La sensibilidad diagnóstica de este análisis es del 95% (IC al 95%: 83,5-98,6%) y la especificidad del 96,5% (IC a 95%: 88,1-99%) (Soldateschi y cols, 1999).

Brevemente el procedimiento es el siguiente: incubación de la muestra de suero sobre una fase sólida recubierta de la nucleoproteína de vTOS, antígeno viral recombinante altamente purificado. Si la muestra contiene IgG específicas frente a vTOS los anticuerpos se unirán a la fase sólida y se detectarán mediante una segunda incubación con anticuerpos monoclonales de ratón anti IgG humana marcados con peroxidasa (conjugado). La adición de un sustrato, tetrametilbenzidina 0,26 mg/ml y peróxido de hidrógeno 0,01%, cuyo color vira a azul en presencia de peroxidasa revela la reacción. Por último se añade una solución de ácido sulfúrico 0,3 M (solución de parada) para obtener un color estable amarillo del que se medirá la absorbancia (DO) a una longitud de onda de 450 nm.

Las muestras se diluyen 1:101, (10 µL de suero en 1ml de tampón de dilución). De estas diluciones se dispensan 100 µL por pocillo. En cada ensayo se incluirán un pocillo de control negativo, un control positivo, dos controles de "punto de corte" y un pocillo de blanco al que se le añadirá 100 µL de sustrato. La placa microtiter se cubre con un film protector y se incuba durante 45mn a 37°C. Tras la incubación se lava cuatro veces con tampón fosfato salino (PBS), con 300 µL de solución de lavado por pocillo. Se añaden 100 µL del conjugado a cada pocillo y se vuelve a tapar la placa e incubar durante otros 45 minutos a 37°C. Se repite la operación de lavado de los pocillos 4 veces, como se indica anteriormente y se dispensan 100 µL de sustrato en cada pocillo. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente se para la reacción

enzimática con 100 μ L de solución de parada. Por último, se realiza la lectura de absorbancia a 450 nm antes de media hora.

Para validar la técnica, los valores de absorbancia individuales de cada control de “punto de corte” deben estar dentro del 25% del valor medio de ambos. El control positivo debe tener una absorbancia de al menos 1,5 veces el valor de los “punto de corte”. El cociente entre el control negativo y el “punto de corte” debe ser menor de 0,6.

Si la absorbancia de la muestra es mayor que la del “punto de corte”, la muestra contiene IgG específica frente a vTOS.

La muestra de suero se considera positiva si el cociente entre la absorbancia de ésta y la del punto de corte es mayor de 1,2. La muestra es negativa si este cociente es menor de 0,8. Si el valor de absorbancia de la muestra está comprendida entre el 20% del valor del punto de corte se considerará el resultado Dudoso.

Las muestras de suero en las que se obtuvo un resultado dudoso fueron analizadas de nuevo. Los resultados dudosos tras repetición se consideraron como negativos a efectos de cálculos estadísticos.

III.2. ESTUDIO CLÍNICO

III.2.1. PACIENTES Y MUESTRAS

De forma retrospectiva se han analizado todos los pacientes con meningitis linfocitaria de los que se envió muestra de LCR para su estudio al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada desde enero 1988 a junio de 2003.

Desde Junio de 2003, fecha en la que se puso en marcha el subproyecto Toscana de la Red de Investigación EVITAR (red de enfermedades víricas transmitidas por artrópodos y roedores), el estudio se realizó de forma prospectiva tanto en enfermos con sospecha de meningitis como de meningoencefalitis aguda de probable etiología viral de los que se recibió muestra de LCR en el laboratorio de microbiología citado.

Se realizó encuesta clínico-epidemiológica (Anexo III.6.1) a todos los pacientes en que se ha aislado virus Toscana, tras contactar directamente con ellos o a partir de su historia clínica. Desde el inicio del proyecto en el año 2003, se obtuvo consentimiento informado (Anexo III.6.2) de cada paciente participante en el estudio.

Los criterios de exclusión del estudio son:

- Pacientes con diagnóstico definitivo distinto a meningitis o meningoencefalitis o etiología no vírica de la misma.
- No disponer de muestra de LCR.

III.2.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

III.2.2.1. AISLAMIENTO DE VIRUS EN CULTIVO CELULAR

Se realizó en la Unidad de Virus/cultivos Celulares del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granda,

utilizando tres líneas celulares heteroploides: Hep-2 (carcinoma de laringe), Vero (riñón de mono verde africano) y RD (rabdiosarcoma); y una línea diploide: MRC-5 (fibroblastos de pulmón humano). Las líneas Hep-2, Vero y RD se mantuvieron en el laboratorio por pases sucesivos, con “Medio Esencial Mínimo” (MEM) de Eagle suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (gentamicina 40 mg/ml, vancomicina 50 mg/ml, Anfotericina B 0,25 mg/ml). Las MRC-5 eran suministradas comercialmente cada 15 días, (Biomerieux, Paris) y mantenidas en MEM con un 20% de SFB hasta su uso.

Semanalmente se preparaban tubos para inoculación de muestras de cada línea celular, que se mantuvieron hasta su inoculación en MEM sin SFB. Siempre se usaron tubos conteniendo como sustrato líneas celulares de pase reciente (menor de 7 días).

Para cada muestra de LCR se utilizaron cuatro tubos conteniendo respectivamente cada una de las líneas celulares citadas. Tras descartar el medio de mantenimiento de los tubos seleccionados, en cada uno de ellos se inocularon 200 μ L de LCR, que se dejaron adsorber sobre las monocapas durante una hora a 35°C. Posteriormente a cada tubo de RD y MRC-5 se añadieron 2 ml de MEM sin SFB, y a los tubos de Vero y Hep-2 MEM suplementado con 1% de SFB. Las muestras así inoculadas se incubaron a 35°C durante un mínimo de 14 días en gradillas que mantenían una inclinación de 15°.

Diariamente se observaron los cultivos para la detección de efecto citopático (ECP) característico. En general los ECP buscados y tiempo de aparición de los virus más frecuentemente implicados en meningitis y meningoencefalitis son:

- Los Enterovirus producen ECP tras 3-10 días en MRC-5 y/o RD y/o Vero, con destrucción masiva de la monocapa

- El vTOS y otros *Phlebovirus* crecen entre 3-7 días de incubación, produciendo destrucción masiva de la monocapa de células Vero, sin que afecte al resto de líneas celulares (Figura 10).

- El virus de la Parotiditis se desarrolla en células Vero, tras 7-10 días, produciendo grandes sincitios.

- Adenovirus crece en Hep-2, despegando la monocapa con típico aspecto en racimos en suspensión, tras 5-7 días de incubación.

-VHS 1 y 2, crecen en Vero y MRC-5 produciendo un redondeamiento y agrandamiento celular y posterior despegue de la monocapa, tras 18-72 horas de incubación.

-VVZ produce un efecto con redondeamiento focalizado en la monocapa de células MRC-5 tras 7-10 días.

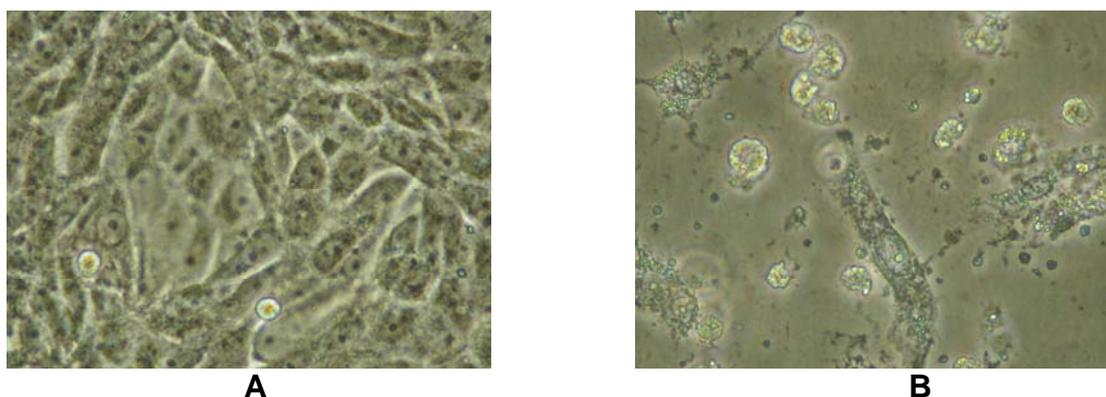


Figura 10. Aspecto de línea celular Vero, A: previo a la inoculación de muestra y B: tras detección de ECP producido por virus Toscana

III.2.2.2. IDENTIFICACIÓN DE VIRUS AISLADOS EN CULTIVO CELULAR

Tras detección del ECP la identificación de los virus, excepto vTOS, se realizó por inmunofluorescencia (IF) con anticuerpos monoclonales específicos; indirecta (IFI) para enterovirus y parotiditis (DAKO Cytomation, Dinamarca) y directa (IFD) para adenovirus, VHS1, VHS2 y VVZ (IMAGEN, DAKO Cytomation, Dinamarca).

El virus Toscana se sospechó cuando se observó ECP en células Vero y las IFI a Enterovirus y Parotiditis fueron negativas. La identificación presuntiva de VTOS se realizó mediante pruebas físico-químicas: resistente a 5-bromo-2'-desoxiuridina (*virus RNA*) sensible al cloroformo (*virus envuelto*) y al pH ácido. La confirmación se realizó por pruebas de neutralización de ECP con antisueros de ratón específicos frente a VTOS (suministrados por Dra L

Nicolletti, Istituto Superiore di Sanita, Roma) y posteriormente mediante PCR en el Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

III.2.2.2.A. Inmunofluorescencia para identificación de virus a partir de líneas celulares infectadas en cultivo tradicional:

A: Preparación de las extensiones: Se despegan las células de la pared del tubo con una pipeta Pasteur estéril de plástico sin tirar el medio de cultivo y se pasa a un tubo de microcentrífuga. A continuación se centrifuga a 13000 rpm durante 5 minutos. Tras decantar el sobrenadante se resuspenden las células del sedimento en 1 ml de PBS pH= 7,2 y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Posteriormente se descarta el sobrenadante, dejando sólo unos 0,2 ml del mismo en el que se resuspenden las células. En portaobjetos multipocillos para fluorescencia, se depositan 10 µl de la suspensión celular anterior. Tras dejar secar el porta a temperatura ambiente se fija con acetona a temperatura ambiente (Herpes simple 1 y 2, VVZ) o acetona fría a -20°C (enterovirus y parotiditis) durante 10 minutos.

B: Tinción:

-Inmunofluorescencia directa:

Añadimos 10 µl por pocillo del anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína, específico frente al virus a estudiar. Tras ello incubamos en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos. Lavamos el portaobjetos con PBS pH=7.2 en agitación ligera durante 5 minutos. Dejamos secar y añadimos una gota de glicerina tamponada a cada pocillo. Tras colocar un cubreobjetos observaremos la preparación en microscopio de fluorescencia a 400x.

-Inmunofluorescencia indirecta:

Se colocan 10 µl del monoclonal específico sin marcar en cada pocillo. Incubamos 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Lavamos en agitación ligera

con PBS pH 7,2 durante 10 minutos. Sin dejar secar totalmente añadimos 10 µl de antilgG de ratón marcada con fluoresceína a su dilución de trabajo en PBS pH 7,5 con azul de Evans al 1/10.000. Volvemos a incubar otros 30 mn a 37°C en cámara húmeda. Lavamos en agitación ligera 10 minutos con PBS pH 7,2. Tras dejar secar, añadimos el medio de montaje, glicerina tamponada, y colocamos un cubreobjetos para observar la preparación en microscopio de fluorescencia a 400x.

III.2.2.2.B. Pruebas físico-químicas para identificación de virus a partir de cultivos celulares infectados.

III.2.2.2B.i. INHIBICIÓN DE VIRUS DNA CON 5-BROMO-2-DESOXIURIDINA

Los virus DNA se inactivan por la acción de 5-Br-2-desoxiuridina (BDU) mientras que los virus RNA son resistentes a este tratamiento.

Para la realización de esta prueba se prepara anteriormente una placa microtiter de fondo plano con las células en las que el virus crezca mejor. En cada pocillo de la placa microtiter se reparten 200 µl de la suspensión celular a una concentración de 150.000 células/ml. La placa se sella con film plástico para evitar la evaporación del medio de crecimiento y se incuba a 37°C en atmósfera de CO₂ durante 24-48 horas. Una vez formada la monocapa celular se cambia el medio de crecimiento por MEM sin SFB.

Como control positivo se usa un virus DNA (Virus herpes simples tipo 1) y como control negativo un virus RNA (virus polio 3 vacunal).

Realización de la técnica:

- Se ponen en una gradilla 2 series de 4 tubos estériles para cada virus al que se realice la prueba y los virus control. Rotulamos la primera serie con el

número de aislamiento y N1, N2, N3 y N4 respectivamente y la otra serie con el número de aislamiento y D1, D2, D3 y D4 respectivamente.

- Preparamos una solución de 5B2DU 40 µg/ml en MEM suplementado con 1% de SFB.
- Ponemos 0,9 ml de MEM 1 % SFB en todos los tubos rotulados N, y 0,9 ml de solución 5B2DU en los rotulados con D.
- Dispensamos 0,1 ml del sobrenadante del cultivo del virus problema y de los controles en sus respectivos tubos D1 y N1 y realizamos diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-4} .
- En placa microtiter con línea celular se rotulan 2 series de cuatro pocillos para cada virus a probar y para cada virus control, como D1, D2, D3, D4 y N1, N2, N3, N4 respectivamente. De todos los pocillos seleccionados retiraremos el medio de cultivo y ponemos 200 µl de cada dilución preparada previamente en su pocillo correspondiente, empleando por cada serie una punta de pipeta nueva, y empezando por la dilución más alta (D4 y N4 respectivamente).

El esquema de pocillos inoculados sería el siguiente:

N1	D1	N1	D1	N1	D1
N2	D2	N2	D2	N2	D2
N3	D3	N3	D3	N3	D3
N4	D4	N4	D4	N4	D4

Herpes	Polio	Problema			

- Tras sellar la placa con “parafilm” incubamos en estufa de CO₂ hasta que se detecte crecimiento del virus (al menos 48 horas).
- Si se trata de un virus DNA, habrá ausencia de crecimiento, o crecimiento en las diluciones más bajas de 5B2DU frente a los pocillos sin tratar.

III.2.2.2B.ii. TRATAMIENTO CON CLOROFORMO

Distingue virus envueltos (con cubierta lipídica) de virus desnudos. El cloroformo disuelve la cubierta lipídica de los virus envueltos inactivándolos.

Realización de la técnica:

Se preparan con antelación tubos con la línea celular en la que mejor crezca el virus a identificar.

- Homogeneizamos con pipeta Pasteur estéril el tubo de células en el que ha crecido el virus a identificar.
- Mezclamos 0,2 ml de la suspensión viral con 1,8 ml de MEM 1% de SFB en un tubo estéril de cristal con tapón a rosca.
- Separamos 1 ml en tubo estéril (A).
- Al ml restante, añadimos 0,05 ml de cloroformo y agitamos vigorosamente durante 10 minutos.
- Centrifugamos a 35 x g durante 5 minutos.
- Seleccionamos 3 tubos con línea celular adecuada, de los que retiraremos el medio de mantenimiento que sustituiremos por 2 ml de MEM 1% de SFB y que rotularemos como “tratado”, “sin tratar” y “control de células” respectivamente.
- En el tubo “sin tratar”, inoculamos 200 µl de virus sin tratar (Tubo A).
- En tubo “tratado” inoculamos 200 µl de la fracción superior acuosa resultante de centrifugar el tubo de cristal con cloroformo,
- Incubamos a 37°C.
- Observamos cada día hasta que aparezca ECP en el tubo sin tratar, verificando que el control de células esté bien.

Si es un VIRUS ENVUELTO, no se producirá ECP en el tubo inoculado con la suspensión viral tratada con cloroformo. Si por el contrario, es un VIRUS DESNUDO sí se observará ECP, ya que el cloroformo no habría inactivado el virus.

III.2.2.2.B.iii. TRATAMIENTO CON pH ÁCIDO.

Distingue enterovirus (resistente a este pH) de rinovirus y otros virus sensibles a pH ácido.

Realización de la técnica

- Homogeneizamos con pipeta Pasteur estéril las células del tubo en el que creció la cepa del virus a identificar.
- Preparamos MEM a pH 2,2. Para ello se prepara MEM con todos los suplementos excepto bicarbonato y HEPES. Añadiendo posteriormente ácido clorhídrico 1 N hasta ajustar el pH a 2,2.
- Mezclamos en tubo estéril 0,1 ml de suspensión de células infectadas con 0,9 ml de MEM pH=2,2 e incubamos a temperatura ambiente al menos 10 minutos
- Mezclamos en otro tubo 0,1 ml de células infectadas con 0,9 ml de MEM 1%
(Tubo A)
- Seleccionamos 3 tubos con línea celular adecuada, de los que retiraremos el medio de mantenimiento que sustituiremos por 2 ml de MEM 1% de SFB y que rotularemos como “tratado”, “sin tratar” y “control de células” respectivamente.
- En el tubo “sin tratar”, inoculamos 200 µl de virus sin tratar (Tubo A).
- En tubo “tratado” inoculamos 200 µl de la suspensión de virus mantenida en pH 2,2
- Incubamos a 37°C.
- Observamos cada día hasta que aparezca ECP en el tubo sin tratar, verificando que el control de células esté bien.

Si se trata de un virus resistente al pH ácido (enterovirus) se observará ECP en todos los tubos. Si el virus no es resistente a pH ácido, no se producirá ECP en los tubos inoculados con la suspensión de células tratadas con MEM pH 2,2.

III.2.2.2.C. Prueba de neutralización del efecto citopático (ECP)

Se basa en la capacidad de los antisueros de neutralizar específicamente la infectividad de un virus, el cual no producirá su ECP característico. Se realiza normalmente en cultivos celulares para la caracterización de virus aislados, o

bien para detectar la presencia de anticuerpos frente a determinados virus (Hsiung, 1994).

Material:

- 1- Células sensibles al virus a probar.
- 2- Suspensión del virus, conteniendo 100 TCDI₅₀ / 0,1 ml (Anexo III.6.3).

Realización de la técnica:

- Mezclamos volúmenes iguales de una dilución del virus problema de 100 TCDI₅₀ por 0,1 ml y de antisuero específico a una concentración de 20 unidades neutralizantes. Una unidad equivale a la mayor dilución del suero que neutraliza 100 TCDI₅₀ de infectividad viral.
- Incubamos esta mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora
- Inoculamos 200 µl de la mezcla en 2 a 4 tubos o pocillos con las células adecuadas para el crecimiento del virus.
- Realizamos lectura diaria de los cultivos durante 5 a 7 días.
- Si el ECP de 100 TCDI₅₀ se inhibe completamente con el antisuero específico, se considera que el antisuero ha neutralizado el virus y por tanto quedaría identificado.

III.2.2.3. DETECCIÓN DE VIRUS MEDIANTE PCR

Desde el comienzo del proyecto Toscana en junio de 2003, a los LCR de pacientes incluidos en el estudio, además del cultivo viral se les realizaron determinaciones de biología molecular para detectar la presencia de VHS 1 y 2 y VVZ en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y *Alphavirus*, *Flavivirus*, *Phlebovirus*, *Bunyavirus*, *Arenavirus*, *Enterovirus* en el Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas del Centro Nacional de Microbiología de Madrid.

Así mismo, desde dicha fecha las técnicas de biología molecular se han utilizado para identificación de las cepas de vTOS aisladas en muestras clínicas por cultivo.

III.2.2.3.A. Extracción de ácidos nucleicos

III.2.2.3.A.i. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA DETECCIÓN DE VHS 1,2 Y VVZ

Se utilizó el kit comercial QIAamp DNA blood mini kit de QIAGEN (Hilden, Alemania), realizándose la técnica siguiendo las instrucciones del fabricante:

En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se añade 200 µl de tampón de lisis AL, 20 µl de proteasa previamente reconstituida, 5 µl de control interno del kit de amplificación, y 200 µl de la muestra o control. Previa agitación se incuba la solución a 56°C durante 10 minutos. Se añaden 200 µl de etanol absoluto, se agita en vortex y se transfiere la solución a la columna Qiamp. Se centrifuga a 6000 x g durante 1 minuto, y se realizan dos lavados consecutivos con tampón AW1 y AW2, añadiendo el tampón a la columna y centrifugando en cada paso. Finalmente, los ácidos nucleicos se eluyen con 60 µl de tampón AE, que se añaden a la columna y se centrifuga a 6000 x g durante 1 minuto. El líquido obtenido contiene el DNA extraído de la muestra. Éste se conservó a 4°C hasta 24°C y si el tiempo de procesamiento fue mayor, a -20°C (Figura 11).

Junto con las muestras, se realiza extracción de un control negativo (agua estéril) y controles positivos de VHS y VVZ (cepas crecidas en Vero y MRC-5 respectivamente y congeladas a -80°C).

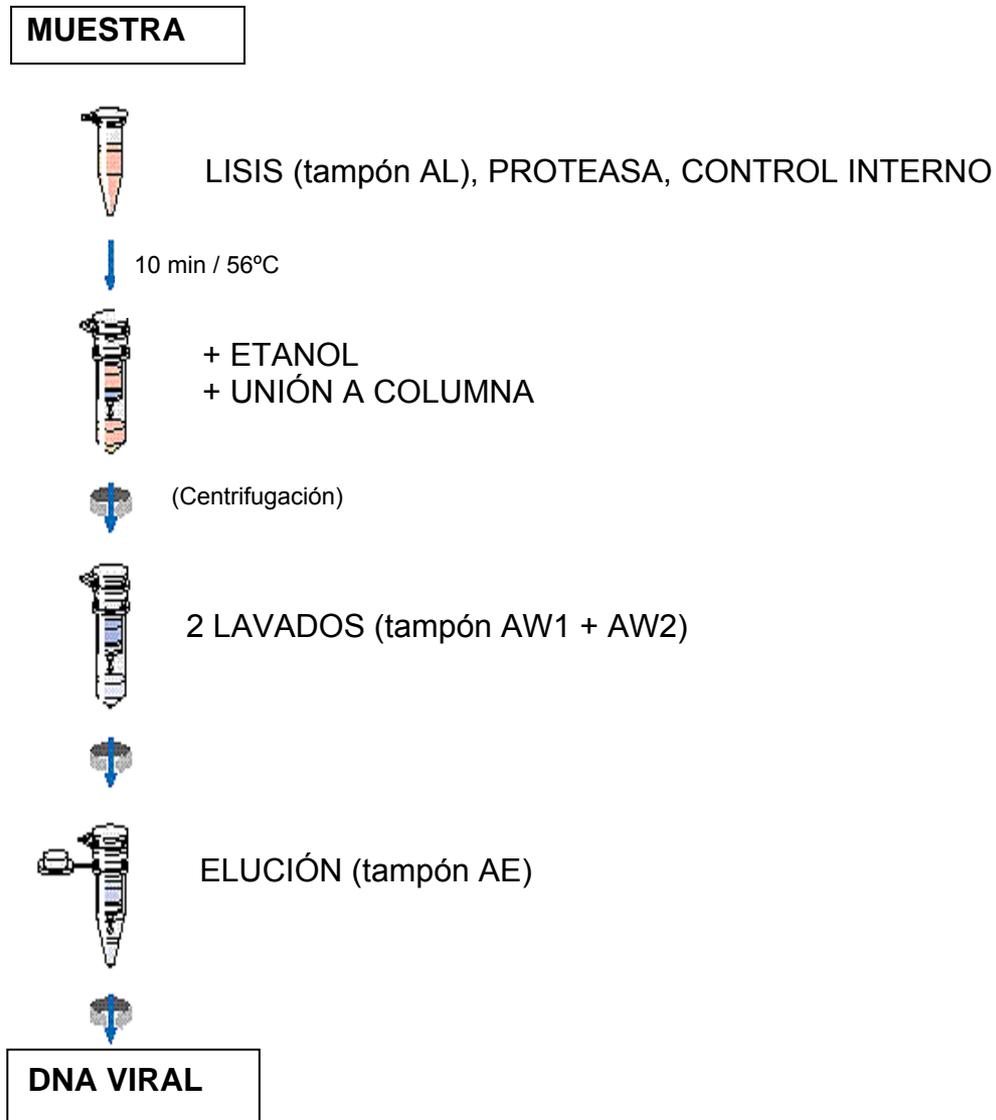


Figura 11. Esquema de extracción DNA viral

III.2.2.3.A.ii. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA DETECCIÓN DE VIRUS RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el kit comercial QIAamp Viral RNA de QIAGEN (Hilden, Alemania).

Este método de extracción es similar al utilizado para extracción de DNA y está basado en la capacidad de las membranas de silica gel de unir selectivamente RNA, junto con la velocidad de centrifugación. La lisis de la muestra se realiza bajo condiciones desnaturizantes para inactivar las

RNAsas. Para aumentar el rendimiento de extracción de RNA, el buffer de lisis incluye además “carrier de RNA”.

Este sistema de extracción se utilizó para la extracción de ácidos nucleicos virales directamente de la muestra de LCR, de cepas de virus cultivadas en líneas celulares, y de muestras de insectos. A 250 µl de LCR para detección molecular se le añadió 1 mL de tampón de lisis AVL previamente reconstituido con “carrier RNA”. En el caso de los flebotomos, por cada 50 individuos se añadió 200 µl de tampón AVL. Todas las muestras se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

Tras descongelar las muestras en tampón de lisis, se separan 700 µl en un tubo estéril, se agita en vórtex para eliminar cristales y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 560 µl de etanol absoluto, se transfiere toda la solución a la columna Qiamp y se continúa el proceso de igual forma que para la extracción de DNA (ver apartado II.3.2.1). El RNA se eluyó con 60 µl tampón AVE (en lugar del tampón AE utilizado para extracción de DNA) siguiendo igualmente el mismo procedimiento que en el protocolo de extracción de DNA. El líquido obtenido contiene el RNA extraído de la muestra y se conservó a -80°C hasta su proceso de amplificación.

III.2.2.3.B. Amplificación de ácidos nucleicos

III.2.2.3.B.i. MULTIPLEX PCR SECUENCIAL PARA DETECCIÓN DE HERPESVIRUS Y ENTEROVIRUS

En el diagnóstico de las infecciones neurológicas por Herpesvirus (virus DNA) y Enterovirus (virus RNA) se utilizó una PCR secuencial múltiple que permitió detectar en el LCR de los pacientes la presencia de estos virus. En esta PCR se utilizan 14 oligonucleótidos en la primera reacción de amplificación y otros 14 en la segunda amplificación. Los cebadores para enterovirus van dirigidos hacia la región conservada del genoma 5'NCR. La

diana de los cebadores para Herpesvirus se halla dentro del gen de la DNA polimerasa.

Brevemente, el protocolo de amplificación consiste en un primer paso de retrotranscripción en el que 5 µl del extracto de ácidos nucleicos de la muestra se añade a 15 µl de mezcla de retrotranscripción compuesta por: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 10 mM DTT, 3 mM MgCl₂, 0,5mM de cada dNTP, 5 pmol de primer antisense para enterovirus, 100 U M-MLV RTasa y 10 U de inhibidor de ribonucleasa. Se incuba esta mezcla a 37°C durante 30 min y a 95°C 10 min, tras lo cual se añaden 30 µl de mezcla de PCR de primera amplificación. Esta mezcla se compone de 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 2 mM Mg Cl₂, 10 pmol de cada cebador sense y antisense para enterovirus, 5 pmol de cada uno de los 12 cebadores para herpesvirus y 2,5 U Taq polimerasa. El ciclo de amplificación es el siguiente: 94°C/1min+ 72°C/1min + 45x (94°C/30s + 64°C/30s + 72°C/30s) + 72°C/5min.

Se añaden 5 µl del producto de amplificación de la primera PCR al tubo de mezcla de nested-PCR conteniendo 60 mM Tris-HCl (pH 8,5), 15 mM sulfato amónico. 2 mM MgCl₂, 0,5 nM de cada dNTP, 10 pmol de cada uno de los 14 primers sense y antisense para enterovirus y herpesvirus, y 1,25 U de Taq polimerasa. El ciclo consta de 94°C/2min + 30x (94°C/30s + 47°C/30s + 72°C/30s) + 72°C/5min (Casas y cols, 1997).

III.2.2.3.B.ii. RT-PCR SECUENCIAL (NESTED) PARA DETECCIÓN DE ARBOVIRUS

La mayoría de los Arbovirus de importancia sanitaria para el hombre pertenecen a los géneros *Alfavirus*, *Flavivirus* y *Phlebovirus*, que son virus RNA.

Se trata de una RT-PCR ya que se requiere una primera conversión del RNA viral a DNA complementario (cDNA) mediante transcripción inversa y una posterior amplificación del cDNA por PCR.

Además es una PCR secuencial en la que se realiza una primera amplificación del cDNA y el producto de amplificación obtenido se usa como molde en una segunda PCR, usando cebadores que se unen a una región interna del producto de la primera amplificación. Con ello se consigue aumentar la especificidad y sensibilidad de la técnica.

Con esta PCR se detectan y diferencian los virus de los tres géneros anteriormente mencionados. Se utilizan seis parejas de cebadores degenerados, dos por cada género. Los fragmentos amplificados de cada género son de distinto tamaño y se distinguen fácilmente en la detección mediante electroforesis.

Para la primera reacción de PCR se usaron los siguientes cebadores:

ALFA1+ 5'- gA[TC]gCITA[TC][TC]TlgA[TC]AtggTlgAlgg
ALFA1- 5'- C[gT][TC]TC[TC]TCIgT[gA]Tg[TC]TTlgTICClgg
FLAVI1+ 5'- gA[TC][TC]TlggITg[TC]ggllgllggI[gA]gITgg
FLAVI1- 5'- TCCCAICClgCl[gA]T[gA]TC[gA]TCIgC
PHLEBO1+ 5'- ATggA[gA]gg[gC]TTTgT[gC][AT][gC]IC[TC]CCC
PHLEBO1- 5'- AAgTTgCTIg[AT][gA]gC[TC]TT[AC]Ag[AC]gTlgC

En la primera parte de la reacción se añaden 5 µl de muestra al tubo de reacción con 45 µl de la mezcla de PCR, que contiene 2 mM de MgSO₄ 300 µM de mezcla de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs), 40 pmol de los iniciadores ALFA 1+, ALFA 1-, PHLEBO 1+, PHLEBO 1- y 80 pmol de FLAVI 1+, FLAVI 1-, 5 U de Transcriptasa inversa (AMV RT) y 5 U de Tfl DNA Polimerasa. Todos los reactivos, salvo los cebadores, son del sistema Aaccess RT-PCR System (Promega, Madison, WI).

Los tubos de reacción se colocan en un termociclador con el siguiente programa: incubación inicial de 38°C durante 45 min para la conversión del RNA en cDNA, seguido de una desnaturalización a 94°C durante 2 min. Posteriormente se realizaron 40 ciclos de PCR de: 94°C / 30 seg + 40°C / 4 min + 68°C / 1 min y 15 seg. Por último se realiza una incubación a 68°C durante 5 min.

Los tamaños de los productos de amplificación esperados tras esta primera reacción son 481 pb para *Alphavirus*, 1385 pb para *Flavivirus* y 550 pb para *Phlebovirus*.

Para la reacción secuencial de la PCR se toma 1 µl del producto de la primera amplificación que servirá como molde y se añade a un tubo de reacción que contiene 49 µl de la mezcla de reactivos necesarios para esta segunda PCR.

Los cebadores que se utilizan en esta segunda parte hibridan con una zona interna de la secuencia del fragmento amplificado en la primera reacción. Las secuencias de estos cebadores son:

ALFA2+ 5'- gIAA[TC]Tg[TC]AA[TC]gTIACICA[gA]Atg
ALFA2- 5'- gC[gA]AAIA[gA]lgClgClgC[TC]T[TC]lggICC
FLAVI2+ 5'- [TC]g[TC][gA]TI[TC]A[TC]A[AT]CA[TC][gC]Atggg
FLAVI2- 5'- CCA[gA]TgITC[TC][gT][TC][gA]TTIAI[gA]AAICC
PHLEBO2+ 5'-AT[TC]CC[AC]AA[gA]CCICA[gC]AagATg
PHLEBO2- 5'-TC[TC]TCTTT[gA]TT[TC]TT[gA]A[gA][gA]TAACC

La mezcla de reacción contiene 4 mM de MgCl₂ (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT), 0,8 mM de dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia), 40 pmol de los iniciadores ALFA 2+, ALFA 2-, PHLEBO 2+, PHLEBO 2- y 40 pmol de la pareja de iniciadores FLAVI 2+, FLAVI 2-, y 1 U de AmpliTaq DNA Polimerasa (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT).

El programa de termociclador para esta segunda PCR (nested o secuencial) es el siguiente: 94°C durante 2 minutos; 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 4 mn y 30 segundos a 72°C; y finalmente un ciclo de 5 minutos a 72°C.

Los productos finales de amplificación tienen unos tamaños de 195 pb para *Alphavirus*; *Flavivirus*, 143 pb; y 244 pb para *Phlebovirus*. (Sánchez Seco y cols, 2003).

III.2.2.3.C. Detección de los productos de amplificación de PCR

Para detectar si ha habido amplificación y de qué tipo se usa la electroforesis en gel de agarosa al 2% con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio, preparado en tampón TBE (Tris-Bórico-EDTA). En cada gel se añade un indicador de pesos moleculares de 1 Kb (Boehringer Mannheim, Alemania). La visualización de las bandas se hace bajo luz ultravioleta. En la figura 12 se observan las bandas obtenidas para *Phlebovirus*, *Alphavirus* y *Flavivirus* con la PCR múltiple genérica para detección de Arbovirus.

Al tubo de reacción de la nested PCR se le añaden 5 µl de azul de bromofenol que servirá como indicador del avance de la banda en el gel de agarosa durante la electroforesis. De esta mezcla se cargan 10 µl por pocillo.



Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) de los productos de amplificación de la RT-nested-PCR múltiple para Arbovirus. MW: Peso molecular; TosV: virus Toscana (*Phlebovirus*), EeeV: virus de la Encefalitis equina del este (*Alphavirus*); YfV: virus de la fiebre amarilla (*Flavivirus*).

III.2.2.4.SEROLOGÍA: DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE A VIRUS TOSCANA

III.2.2.4.A. EIA Enzywell Toscana virus IgG

La detección de anticuerpos IgG específicos frente a Toscana se realizó en muestras de suero de fase aguda, suero de fase convaleciente y/o LCR, mediante el método anteriormente descrito en el apartado III.1.2.

III.2.2.4.B. EIA Enzywell Toscana virus IgM

Para la detección de anticuerpos IgM se utilizó un kit de la misma casa comercial que para IgG (Enzywell Toscana virus, DIESSE, Siena, Italia). En este caso se trata de un EIA de captura, en el que los pocillos de la placa microtiter están recubiertos con anticuerpos monoclonales anti-IgM humana. Brevemente, el proceso es el siguiente: se inoculan los pocillos con 100 µl de los sueros a analizar diluidos 1:100 y se incuba la placa a 37°C durante 45 min, tras lo cual se lava la placa con tampón de lavado. A continuación se añaden a cada pocillo 100 µl del antígeno recombinante Nr biotinilado junto con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa y se incuba durante otros 45 min a 37°C. Se lava la placa con tampón de lavado y entonces se añaden a cada pocillo 100 µl del sustrato, tetrametilbencidina, incubándose durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción enzimática se para con 100 µl por pocillo de ácido sulfúrico 1N y se procede a la lectura de la absorbancia a longitud de onda de 450nm (Soldateschi y cols, 1999).

Los criterios de positividad y negatividad son iguales a los descritos para la detección de IgG en el apartado III.1.2.

III.2.2.4.C. Neutralización del efecto citopático de vTOS

La base y realización de la técnica es la misma que la explicada en el apartado III.2.2.2.C. pero en este caso, en vez de utilizarla para identificar la cepa de un virus servirá para determinar si el suero de un paciente contiene anticuerpos neutralizantes específicos frente a vTOS. Para ello enfrentamos diluciones dobles seriadas del suero problema a una cepa conocida y valorada de vTOS. Si la muestra contiene anticuerpos específicos frente a vTOS, neutralizará al virus evitando el ECP que produciría sobre el cultivo celular

(Vero), siendo el título la máxima dilución del suero que es capaz de inhibir el ECP.

III.3. ESTUDIO DE VECTORES

III.3.1. ESTACIONES DE CAPTURA

Para determinar las zonas donde realizar muestreo y captura de flebotomos tuvimos en cuenta la localización geográfica de los 17 pacientes que, antes del comienzo de este estudio, ya habían sido diagnosticados de meningitis por vTOS por aislamiento del virus en muestras de LCR. Conseguimos contactar con 13 de estos pacientes, a los que se les realizó una breve encuesta epidemiológica para tratar de determinar en qué área geográfica pudieron ser infectados. Basándonos en estos datos buscamos estaciones de capturas lo más próximas y parecidas posibles a las áreas probables de infección, en las que el entorno fuese propicio para el desarrollo de flebotomos (Figura 13). Algunos de estos pacientes dieron su consentimiento para la realización de capturas de insectos en sus propias fincas y domicilios.

Las localizaciones elegidas fueron:

1A Huétor-Tájar: En casa de un paciente que tuvo una meningitis por vTOS el año anterior (julio 2002)

1B Huétor-Tájar: Parcela cercana al domicilio del paciente (unos 100 m) en la que tienen caballos y perros

2A Cúllar-Vega: Urbanización de chalets y viviendas unifamiliares con parcelas.

3A La Zubia: Establo de caballos

3B La Zubia: Carril Ogíjares. Establo con ovejas, gallinas y aves, colindante con viviendas familiares.

3C La Zubia: Zona Cumbres Verdes. Cortijo con ganado caprino

3D La Zubia: Cortijo, casas rurales turísticas. Perros de caza

4A Monachil: Cortijo. Granja con vacas, cerdos, gallinas, conejos, caballos, perros etc.

5A Víznar: Cortijo. Granja de ovejas, cabras, gallinas

6A Alfacar: Establo de ganado caprino junto al cementerio (Figura 14)

7A Jun: Domicilio de un paciente que contrajo meningitis por vTOS en octubre de 2003. Casa de campo con corrales con aves, cerdos, establos para caballos y perros (Figura 14).

8A Granada: Carretera Granada-Jun. Establos con caballos y ponis.

9A Torvizcón: Casa de campo. Cerdos, aves, mulo

10A Güájar Faragüit: Nave con gallinas

11A Restábal: Casa de pueblo con nave para gallinas y conejos

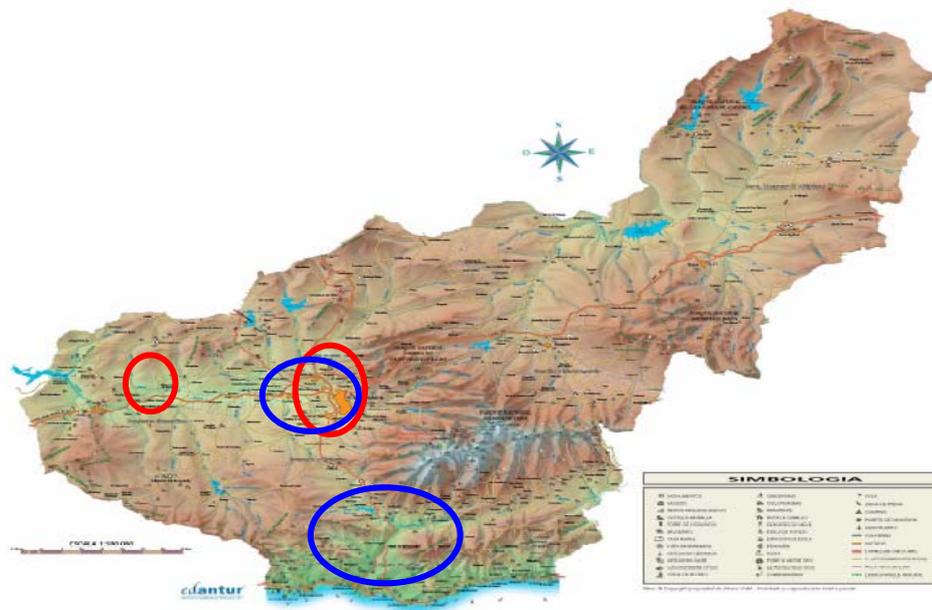


Figura 13. Zonas de trampeo para captura de flebotomos durante los años 2003 (círculo rojo) y 2004 (círculo azul)



Figura 14. Estaciones de captura de flebotomos. A: Alfacar, B: Jun

III.3.2. CAPTURA DE FLEBOTOMOS

Se realizaron capturas periódicas quincenales durante los meses de junio a octubre de los años 2003 y 2004.

Para las capturas de flebotomos se utilizaron trampas de luz CDC (Toms River, New Jersey, USA). Estas trampas constan de un cilindro de metacrilato conectado a una batería de 6 voltios; esta batería hace funcionar una pequeña bombilla y una hélice aspiradora situados en el extremo superior del cilindro. Por el otro extremo de la trampa se acopla una bolsa de tul en la que se van recogiendo los insectos (Figura 15). La luz de la bombilla atrae a los insectos y cuando éstos están cerca de la boca de la trampa, la hélice los aspira hacia el interior de la bolsa de tul e impide que vuelvan a salir. Este sistema permite capturar vivos a los flebotomos.



TRAMPAS DE LUZ CDC

Figura 15. Trampas de luz CDC

Las trampas se colocan al atardecer en las localizaciones elegidas, anotando claramente el número de trampa y batería usadas en cada localización (Figura 16) y se recogen al día siguiente al amanecer antes de que salga el sol, ya que los flebotomos son muy sensibles a las temperaturas extremas y a la desecación. Si se van a colocar las trampas a la intemperie, se les puede poner una bandeja protectora que evita que los ejemplares capturados mueran por el frío de la noche. Por otro lado los insectos capturados deben congelarse a -80°C lo antes posible, durante media hora, para matarlos rápidamente e impedir posibles alteraciones de la muestra.



Figura 16. Ejemplo de colocación de trampa CDC para captura de flebotomos en una de las viviendas seleccionadas

Durante el año 2003 los flebotomos machos se conservaron en etanol 96° para su posterior clasificación por especie. Las hembras se agruparon en lotes de 50 a 100 individuos conservadas en viales con 200 a 400 µl de tampón de lisis AVL/carrier DNA a -80°C y se enviaron al laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda) para detección de Arbovirus mediante la técnica de RT-PCR secuencial anteriormente descrita (Apartado I.2.B).

Durante el segundo año del estudio (2004) se separaron los flebotomos machos de hembras y ambos grupos se procesaron por separado para cultivo de virus en línea de células Vero y detección de Arbovirus mediante PCR.

Cuando el número de individuos capturados fue elevado se separó un 10% de los flebotomos, tanto machos como hembras, para clasificarlos por especies.



Figura 17. Esquema de procedimiento de separación de flebotomos del resto de insectos capturados en trampas y posterior preparación de lotes diferenciados para biología molecular y cultivo

III.3.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS FLEBOTOMOS

De cada localización, separamos los flebotomos del resto de los insectos y dentro de los primeros los machos de las hembras (Figura 18)

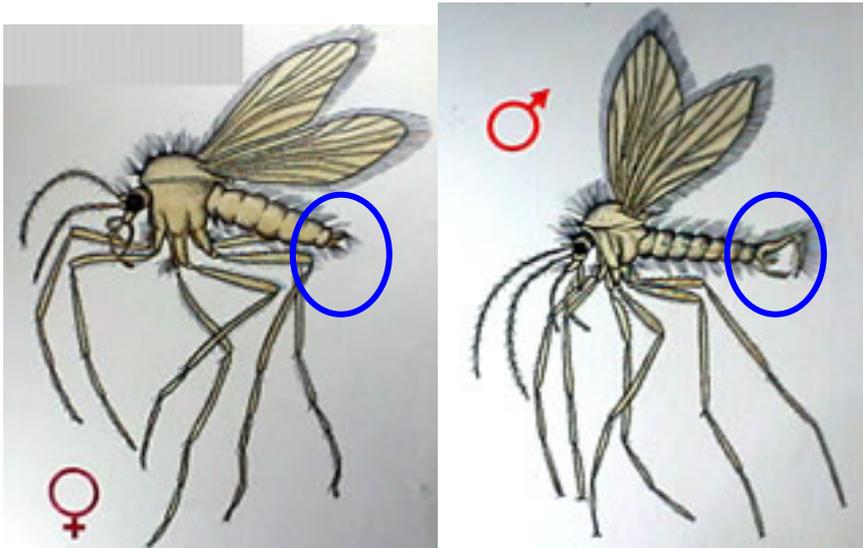


Figura 18. Principales características diferenciales entre flebotomos hembras y machos

La clasificación taxonómica se realizó según las características morfológicas de los especímenes descritas en apartado 1.5.2, fundamentalmente, forma de las alas, genitalia en los machos y espermateca en las hembras.

Los individuos reservados para clasificación se conservaron en etanol 96°, en frascos herméticos identificados por fecha y lugar de captura (localización), hasta que fueron montados en preparaciones permanentes.

III.3.3.1. TRANSPARENTADO

Para facilitar la observación de las estructuras anatómicas en las que se basa la clasificación de los flebotomos, éstos han de someterse a un tratamiento de transparentación. Éste se realiza con un transparentador y calor que consigue transparentar algunas partes quitinosas del insecto y permite ver con mayor claridad la morfología de las estructuras de mayor importancia taxonómica.

Para el transparentado se utilizó la solución de Marc André, cuya composición es una mezcla de ácido acético glacial (30 ml), hidrato de cloral (40 gr) y agua destilada (30ml) (Abonnenc, 1972).

En un vaso de precipitado resistente al calor se cubren los flebotomos con Marc André y se calientan a la llama durante uno o dos minutos, retirando de vez en cuando el vaso para evitar que alcance el punto de ebullición.

Dejar enfriar a temperatura ambiente

III.3.3.2. MONTAJE

Tras enfriar los flebotomos transparentados, con una pipeta Pasteur se aspira la solución de transparentado, con cuidado de no arrastrar ningún flebotomo. Desechar el líquido.

Los flebotomos se montan entre porta y cubreobjetos en un medio de montaje adecuado. Nosotros hemos usado el medio tipo Berlese (Lewis, 1973) cuya composición es la siguiente:

Goma arábica 12 gr, hidrato de cloral 20 gr, ácido acético glacial 5 ml, solución de glucosa al 50% w/w 5 ml, agua destilada 40 ml (Lewis, 1973). Los componentes deben mezclarse en este mismo orden.

Los portaobjetos sobre los que se van a montar los flebotomos se desengrasan sumergiéndolos durante unos segundos en una mezcla al 50% de éter y etanol.

Se dejan secar al aire. Extender una gota de Berlese en el portaobjetos desengrasado. Con unas pinzas o agujas se coge un ejemplar y se seca un poco con papel el resto de Marc André que pudiera tener. Se coloca sobre el porta con Berlesse teniendo la precaución de que no queden las alas o el cuerpo doblado y se puedan ver bien todas las estructuras. Se pueden montar varios ejemplares en el mismo portaobjetos. Colocar un cubreobjetos lentamente, evitando la formación de burbujas de aire. Apretar ligeramente el cubre y porta para distribuir bien el Berlese

Dejar secar los portaobjetos en estufa a 37°C durante 1 ó 2 días, o a temperatura ambiente durante una semana, hasta que se haya endurecido el medio de montaje.

III.3.3.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS FLEBOTOMOS ESPAÑOLES

Una vez secas las preparaciones se examinaron con objetivo de 10 a 100x en microscopio óptico. En la actualidad en España se conocen dos géneros y un total de 12 especies. Las principales características morfológicas de los flebotomos adultos españoles en las que hemos basado la clasificación taxonómica son las siguientes:

En las figuras 19A y 19B se representan las estructuras de mayor importancia taxonómica de los flebotomos machos y hembras españoles.

El género *Sergentomyia*, en los machos adultos, es característico el estilo con 4 espinas, todas terminales y una larga seta no caduca subterminal. En las hembras las principales características diferenciales son el cibario armado con dientes y el reservorio de la espermateca liso, con aspecto amorcillado (Gallego Berenguer y cols, 1992; Gil Collado y cols, 1989).

Los machos del género *Phlebotomus* tienen 4 ó 5 espinas en el estilo, siendo sólo 2 ó 3 de ellas terminales. En el subgénero *Larroussius* (*P. perniciosus*, *P. longicuspis*, *P. ariasi*, *P. longeroni*) el estilo es corto, con 5

espinas terminales. El subgénero *Paraphlebotomus* (*P.alexandri*, *P.chabaudi*, *P.sergenti*) se diferencia por su estilo fusiforme corto y rechoncho, con 4 espinas largas, 2 de ellas apicales; los parámetros son espatulados; el tufo de setas se inserta en el coxito en un lóbulo basal bien desarrollado. En las hembras los reservorios y conductos de la espermateca son anillados, estos últimos sin modificaciones basales. La armadura faríngea tiene aspecto reticulado.

Los machos del subgénero *Phlebotomus* (*P.papatasi*) tienen el estilo largo y delgado, con 5 espinas cortas, 3 apicales y dos submedianas. Los parámetros son trilobulados. En las hembras las espermatecas presentan reservorios y conductos anillados sin modificaciones basales; las cabezas son sésiles. La armadura faríngea presenta escamas en filas transversas.

De las especies antropofílicas, *P. perniciosus* es la especie más abundante y ubicua en España. Los machos presentan genitalia con las características del subgénero *Larrousius*, siendo el principal carácter diferenciador la forma de las valvas del pene, que terminan en horquilla. Las hembras presentan espermatecas con 10 ó 12 anillos de distinto tamaño, cuello bastante largo y conductos espermáticos estriados, presentan en su parte anterior una dilatación o reservorio con paredes espesas y refringentes, y con una luz estrecha y de forma cónica.

P.longicuspis es una especie muy próxima a la anterior, los machos se diferencian porque las valvas del pene están terminadas en punta aguda, única e incurvada hacia dentro. Las hembras se distinguen de las de *P.perniciosus* por la forma de la dilatación que aparece en la parte anterior de los conductos espermáticos y que es ligeramente bilobulada y con paredes menos gruesas.

P.ariasii se distingue por la forma del aedeagus que es mazudo y por la existencia en el coxito de un tufo de sedas que varía entre 16 y 32. Las hembras tienen espermatecas con 12-14 anillos de diámetro casi uniforme, cuello espermático corto, y con conductos espermáticos con una dilatación

fusiforme en su extremo anterior. *P. ariasi* es, en líneas generales, de mayor tamaño que *P. perniciosus* y *P. longicuspis*.

P. sergenti se caracteriza por presentar un estilo rechoncho con 4 espinas y un lóbulo basal en el coxito coronado por un penacho de sedas no muy largas ni numerosas. Las valvas peneanas son tronco cónicas con extremo en punta aguda e incurvada hacia dentro. Las hembras tienen espermatecas con 4 a 6 anillos, siendo el distal casi tan alto como ancho. La faringe está formada por escamas ovoides que se prolongan anteriormente en unos filamentos sinuosos y agudos.

P. papatasi se puede diferenciar del resto de las especies españolas, prácticamente a simple vista ya que la genitalia está muy desarrollada. Tiene un estilo largo y delgado, con 5 espinas cortas; un tufo de sedas en la parte superior del coxito y un pequeño lóbulo basal en la base de dicha estructura; los parámetros son trilobulados y los lóbulos laterales presentan dos espinas terminales de aspecto espatulado. Las hembras se distinguen por sus espermatecas con 9 ó 10 anillos y cabeza sesil directamente unida al reservorio, que se pueden confundir con las de *P. sergenti*. (Gil Collado y cols, 1989).

En las figuras 19A y 19B se representan las estructuras de mayor importancia taxonómica de los flebotomos machos y hembras españoles.

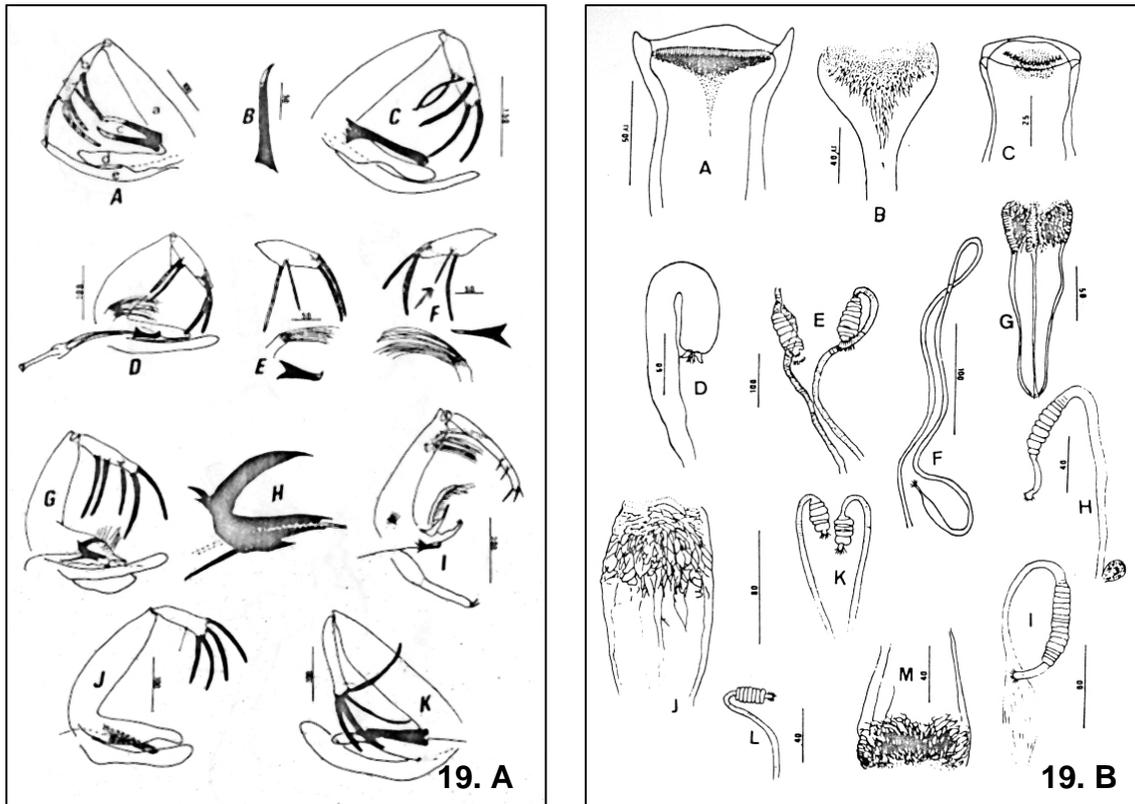


Figura 19.A. Estructuras de mayor importancia taxonómica de los flebotomos machos (genitalia). A: *P. perniciosus*, **B:** *P. longicuspis* **C:** *P. ariasi*; **D:** *P. alexandri*; **E:** *P. sergenti*; **F:** *P. chabaudi*; **G:** *P. fortunatarum*; **I:** *P. papatasi*; **J:** *S. minuta*; **K:** *S. fallax* **Figura 19.B. Estructuras de mayor importancia taxonómica de los flebotomos hembras. A,D:** cibarium y espermateca *S. minuta*; **B,C:** faringe y cibarium *S. fallax*; **E:** espermateca *P. papatasi*; **F,G:** espermateca y faringe *P. fortunatarum*; **H,I:** espermateca *P. perniciosus* y *P. ariasi*; **J,K:** faringe y espermateca *P. sergenti*; **L,M:** espermateca y faringe *P. alexandri*.

III.3.4. AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE PHLEBOVIRUS EN LOS FLEBOTOMOS

Las hembras capturadas durante la temporada de 2003 se conservaron en los viales con 200 µl de tampón AVL-RNA carrier en grupos de hasta 50 individuos y con 400 µl del mismo tampón cuando los grupos eran de hasta 100 individuos.

Estos lotes se analizaron mediante la RT-PCR de Arbovirus descrita anteriormente en el apartado III.2.2.3.

Durante el año 2004, tanto machos como hembras se analizaron por separado mediante RT-PCR y además se inocularon en cultivos de células Vero para intentar aislar posibles virus que estuvieran infectando a los flebotomos (Kauffman y cols, 2003)

Los individuos capturados se agruparon en lotes de hasta 100 individuos, separados por sexo, localización y fecha de captura, y se introdujeron en viales que contenían bolitas estériles de vidrio y 0,5 ml de medio de transporte para virus (MEM suplementado con 20% de suero fetal bovino y 10% de mezcla antibiótica vancomicina 0,5 mg/ml, gentamicina 0,4 mg/ml, anfotericina B 2,5µg/ml). Los viales se agitan en el vortex durante 2 mn para homogeneizar la muestra, tras lo cual se centrifugan durante 5 mn a 13000 rpm. Se separa el sobrenadante del cual se inoculan 200 µl en un tubo de células Vero, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.2.2.1 y el resto se guarda a -80°C.

Al botón de flebotomos que queda en el vial se le añaden de 200 a 400 µl de tampón AVL-RNA carrier en función del número de individuos que contenga el pool y se conserva a -80°C hasta la realización del análisis mediante RT-PCR.

Los tubos de células Vero inoculados se incuban a 37°C. Al día siguiente de la inoculación de los flebotomos se retira el medio líquido de los tubos y se sustituye por 2 ml de MEM 1% fresco. Se observan los tubos cada 2 días hasta

la aparición de ECP. Los tubos se incuban al menos 20 días antes de descartarlos como negativos.

Cuando en algún tubo aparece ECP compatible con la infección por vTOS se le da pase a otro tubo de células vero y se analiza el sobrenadante del cultivo mediante RT-PCR de Arbovirus descrita con anterioridad en el apartado III.2.2.3. Si ésta es positiva, el amplificado se secuencia para determinar de que *Phlebovirus* se trata (ver apartado III.4).

Las cepas de *Phlebovirus* aisladas de los flebotomos se conservan en criotubos de 2 ml en nitrógeno líquido.

III.4. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE PHLEBOVIRUS

Se realizó a cepas de vTOS aisladas en de LCR de paciente con meningitis aséptica en octubre de 2003 y a *Phlebovirus* aislados en lotes de flebotomos

III.4.1. MÉTODO

La secuenciación se realizó a partir de los productos de amplificación de la banda esperada para determinar la especie de virus que contiene la muestra. Para ello se realiza una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión para purificar la banda a secuenciar.

Para purificar el DNA amplificado y separarlo de la agarosa se utiliza el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Este sistema puede extraer fragmentos de DNA de 70 pb hasta 10 kb, de geles de agarosa estándar o de bajo punto de fusión, en tampón Tris Acetato EDTA (TAE) o Tris Borato EDTA (TBE) y purificar el DNA de enzimas, nucleótidos y otros restos. Está basado en microcolumnas con membranas de silica gel que unen selectivamente moléculas de ácido nucleico. La adsorción del DNA a las columnas de silica gel se produce en presencia de alta concentración de sales caotrópicas. La

eficiencia de las columnas es óptima a pH 7,5 o menor, siendo la adsorción del DNA en esas condiciones del 95%. La unión de DNA a las columnas de silica gel se reduce drásticamente a pH básico. Cada columna tiene capacidad para procesar hasta 400 mg de agarosa.

Para realizar la purificación seguimos el siguiente procedimiento:

- 1- Cortar con un bisturí limpio el fragmento de DNA del gel de agarosa e introducirlo en un tubo transparente.
- 2- Pesar el trozo de agarosa y añadir tres volúmenes de tampón QG por cada volumen de agarosa (100 mg de agarosa equivalen aproximadamente a 100 μ l). Si la agarosa pesa más de 400 mg hay que usar más de una columna,
- 3- Incubar a 50°C durante 10 min o hasta que la agarosa se haya licuado completamente.
- 4- Comprobar que el color de la mezcla es amarillo. Si el color es naranja o violeta indica que el pH es > de 7,5 y la eficiencia de la adsorción disminuye. Para corregirlo, añadir 10 μ l de acetato de sodio 3M pH 5 y mezclar bien hasta que la solución haya adquirido color amarillo.
- 5- Añadir 100 μ l de isopropanol por cada 100 mg de agarosa y mezclar. Este paso aumenta el rendimiento de fragmentos de DNA menores de 500 pb y mayores de 4 kb. Para fragmentos de DNA entre 500 pb y 4 kb la adición de isopropanol no mejora el rendimiento.
- 6- Colocar la columna en un tubo de recolección y añadir la muestra. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 mn. La capacidad máxima de la columna es de 800 μ l. Si el volumen de la muestra es mayor cargar la columna otra vez y volver a centrifugar.
- 7- Deshechar el líquido eluído y colocar la columna en el mismo tubo de recolección.
- 8- Añadir 0,5 ml de tampón QG a la columna y centrifugar 1mn. Este paso

La reacción de secuenciación se realiza con el ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

El análisis se realiza mediante el secuenciador automatizado ABI 377 (Applied Biosystems)

III.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos descriptivos y comparativos (chi cuadrado para las variables cualitativas y t student para las variables cuantitativas) de los datos de los estudios de seroprevalencia, infección neurológica y vectores de virus Toscana, se realizaron mediante el programa SPSS 12.0.1. software (SPSS, Chicago, IL). En los análisis comparativos de poblaciones, una $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa con una probabilidad del 95%.

La prevalencia de infección por vTOS en los flebotomos se calculó con el programa Pool Screen 2 (Profesor Katholi, Universidad de Alabama, Birmingham), que permite calcular la tasa de infección a partir de lotes compuestos por un número variable de individuos.

El número de muestras de suero necesarias para el estudio de seroprevalencia se calculó con la fórmula de estimación de proporciones para poblaciones infinitas partiendo de las siguientes premisas: del número de habitantes de la provincia de Granada reflejado en los datos del INE en enero de 2002, una prevalencia estimada a partir de estudios previos del 10% (Mendoza-Montero y cols, 1998), una confianza del 95% y una precisión del 5%.

$$n = \frac{t_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q}{(N-1) \cdot e^2 + t_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q}$$

n= número de muestra
 t_{α} = constante 1,96
p= prevalencia estimada
q= 100 – p
N= tamaño de la población
e= error alfa

Para la estimación de las prevalencias se han calculado intervalos de confianza al 95%.

III.6. ANEXOS

III.6.1. ENCUESTA CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA

VIRUS TOSCANA COMO PATÓGENO EN HUMANOS EN PROCESOS NEUROLÓGICOS: FICHA DE DATOS CLÍNICOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS PACIENTES

Nº HISTORIA CLÍNICA: _____

INICIALES: _____

Nº REGISTRO: ____

1. DATOS DEMOGRÁFICOS

- 1.1. SEXO ___ Hombre ___ Mujer
- 1.2. RAZA ___ Caucásica ___ Negra ___ Otra (especificar)
- 1.3. Fecha de nacimiento ___/___/___
- 1.4. Lugar de residencia (localidad)
- 1.5. Tipo de vivienda ___ Piso ___ Casa rural ___ Otras (especificar)
- 1.6. Fecha residencia actual (desde) ___/___/___
- 1.7. Fecha de consulta ___/___/___
- 1.8. Fecha revisión: ___/___/___

2. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

- 2.1 Viajes recientes (<1 mes): ___ No ___ Si (Especificar lugar y fechas)
- 2.2. Animales domésticos habituales: ___ No ___ Si (especificar)
- 2.3. Contacto ocasional animales (< 1mes): ___ No ___ Si (especificar)
- 2.4. Actividades al aire libre (< 1mes): ___ No ___ Si (especificar)
(Campo, humedales, playa,...) Lugar:
- 2.5. Picaduras / mordeduras de animales ___ No ___ Si (especificar):
(< 1mes) Animal:
 Lugar:
 Fecha:
- 2.6. Trabajo:
- 2.7. Contactos próximos con cuadros sugestivos de viriasis (catarro vías altas, cuadro pseudogripal, gastroenteritis, meningoencefalitis...) (< 1 mes)

3. ANTECEDENTES PATOLÓGICOS O ENFERMEDADES/CONDICIONES DEBILITANTES

___ No ___ Si (especificar, diabetes mellitus, trasplante órganos, cáncer, cirrosis hepática, tratamiento inmunosupresor, otras,...)

4. CLÍNICA

a) Cuadro autolimitado sugestivo de viriasis (< 1 mes)

___ No ___ Si (especificar)

b) Enfermedad actual

- 4.1. Fecha inicio ___/___/___
- 4.2. Temperatura máxima: ___ °C
- 4.3. Malestar general
- 4.4. Cefalea
- 4.5. Mialgias

- 4.6. Artralgias
- 4.7. Síntomas respiratorios
- 4.8. Rash cutáneo
- 4.9. Lesiones cutáneo-mucosas
- 4.10. Síntomas gastrointestinales
- 4.11. Hepato/espleno/adenomegalias
- 4.12. Otras (especificar)

5. DATOS ANALÍTICOS

CONVALESCIENTE	SUERO FASE AGUDA	SUERO FASE
- Fecha toma de muestra	_/_/_	_/_/_
- ANALÍTICA GENERAL		
5.1. Hemoglobina		
5.2. Leucocitos		
5.3. Neutrófilos		
5.4. Linfocitos		
5.5. Monocitos		
5.6. Eosinófilos		
5.7. Basófilos		
5.8. VSG		
5.9. Proteína C Reactiva		
5.10. ALT		
5.11. AST		
5.12. GGT		
5.13. Fosfatasa Alcalina		
5.14. Amilasa		
5.15. CPK		
- SEROLOGÍA TOSCANA		
5.16. IgM	__ Neg __ Pos	__ Neg __ Pos
5.17. IgG (título):	__ Neg __ Pos (título):	__ Neg __ Pos
- CULTIVO LCR		
5.18. cultivo vToscana en células Vero	__ Neg __ Pos	
5.19. cultivo otros virus	__ Neg __ Pos	Especificar.....
- PCR (si procede)		
5.20 RT-PCR TOSCANA	__ Neg __ Pos	
5.21 PCR otros virus	__ Neg __ Pos	Especificar.....

III.6.2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS

TÍTULO DEL ESTUDIO: EVITAR (Enfermedades Víricas Transmitidas por Artrópodos y Roedores) ESTUDIO ETIOLÓGICO DE MENINGITIS Y ENCEFALITIS DE PRESUNTO ORIGEN VIRAL

DONACIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS (SANGRE)

Yo,

.....

....

(Nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con

.....

(Nombre del investigador)

- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Me han informado que mis muestras estarán codificadas y que no se revelará mi identidad a nadie sin mi permiso.
- Permito que se retengan mis muestras de sangre para usarse en el presente estudio y en posibles posteriores estudios de investigación, los cuales sólo podrán estar relacionados con el diagnóstico etiológico de síndromes febriles producidos por el virus Toscana.
- Entiendo y permito que todas las muestras que he proporcionado pasarán a formar propiedad del patrocinador del estudio, y que no recibiré ninguna compensación adicional por esta donación.
- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

.....

Fecha

Firma del participante

Declaro que la naturaleza y el propósito de los procedimientos antes descritos y los riesgos potenciales de la participación del sujeto en el estudio han sido explicados al paciente.

.....

Fecha

Firma de la persona que obtiene el consentimiento informado

III.6.3. CÁLCULO DE LA DOSIS INFECTIVA 50% DE UN VIRUS TRAS CRECIMIENTO EN CULTIVO CELULAR (TCDI₅₀) (Método de Reed y Muench)

- Congelar en nitrógeno líquido 4 alícuotas de la suspensión del virus a identificar.
- Preparar placa microtiter de fondo plano, conteniendo células sensibles al virus a probar.
- Descongelar una alícuota de la suspensión de virus y preparar diluciones en MEM 0% desde 10⁻² a 10⁻⁸ (como mínimo deberá existir 1 ml de cada dilución).
- Retirar el medio de mantenimiento de la placa microtiter.
- Por cada dilución de virus, inocular en la placa 4 pocillos a razón de 200 µl por pocillo.
- Incubar a 35°C con 5% de CO₂.
- A partir de las 72 horas, y diariamente, proceder a la lectura de placa hasta que se observe ECP típico.
- Anotar los resultados para cada dilución como en el ejemplo que sigue:

Dilución	A	B	C	Infectividad	
				Razón	%
10 ⁻³	4/4	9	0	9/9	100
10 ⁻⁴	3/4	5	1	5/6	83
10 ⁻⁵	2/4	2	3	2/5	40
10 ⁻⁶	0/4	0	7	0/7	0

A= n° de cultivo con ECP/ n° inoculados

B= n° acumulativo de infectados

C= n° acumulativo de no infectados

-A continuación, aplicar la siguiente fórmula:

Infectividad sobre el 50% - 50%

Infectividad sobre el 50%- Infectividad bajo el 50%

-En el ejemplo: $83-50/83-40= 0,7$. Esta cifra se sumaría al exponente de la solución que quedaba por encima del 50% ($10^{-4,7}$).

-Con esta fórmula, obtenemos la dilución de esta suspensión de virus que contiene 1 TCDI₅₀/0,1 ml (dosis de virus que infecta a la mitad de los cultivos celulares en que se inocula)

Para calcular la dilución de virus que contenga 100 TCDI₅₀ se aplica la siguiente fórmula

Log título TCDI₅₀ + 2 = Log de la suspensión que contiene 100 TCDI₅₀.

IV. RESULTADOS

IV.1. ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA

Según los cálculos realizados con la fórmula de estimación de proporciones para poblaciones infinitas, en una población de 825.015 habitantes (N) en la que se estima una prevalencia de anticuerpos frente a vTOS (p) del 10%, para que el estudio tenga valor estadístico con un 95% de confianza ($e=5\%$) y una precisión del 5%, el tamaño mínimo de muestra (n) requerido es de 139 sueros.

En total se analizaron 979 sueros. La estratificación por edad, sexo y procedencia se muestra en tabla 5.

Tabla 5. Distribución por áreas geográficas, edad y sexo de los sueros obtenidos en la provincia de Granada para estudio de seroprevalencia de virus Toscana

ÁREA GEOGRÁFICA	< 18 años		18-65 años		> 65 años	
	VARÓN	MUJER	VARÓN	MUJER	VARÓN	MUJER
GRANADA CAPITAL	27	31	88	101	20	23
ÁREA METROPOLITANA	28	28	92	90	21	21
SUR(COSTA/ALPUJARRAS)	19	19	62	62	14	14
ÁREA OESTE/SUROESTE	9	9	29	29	7	7
ÁREA NORTE/NORESTE	16	16	52	52	11	11
TOTAL	99	103	322	334	73	76

La seroprevalencia global de la infección por vTOS en la provincia de Granada fue del 24,9%, observándose un notable incremento conforme aumenta la edad de las personas estudiadas, pasando del 9,4% en menores de

15 años a 60,4% en mayores de 65 años (chi-cuadrado= 123,986; $p < 0,001$). En la figura 20 se muestran la prevalencia de anticuerpos frente a vTOS en los distintos grupos de edad.

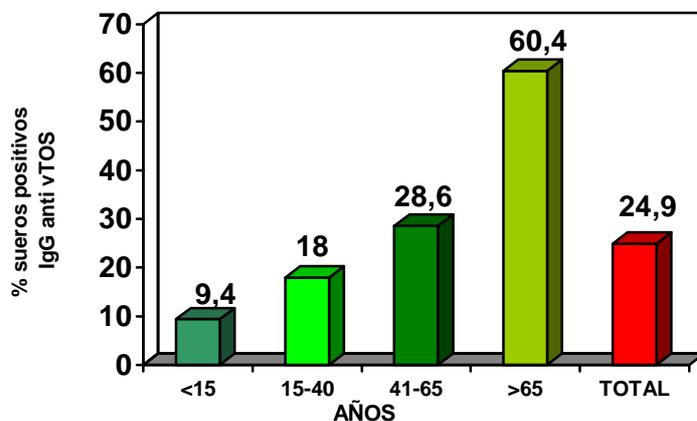


Figura 20. Distribución por edad de la prevalencia de anticuerpos específicos frente a vTOS en la población de la provincia de Granada.

No se observó diferencia estadísticamente significativa en razón del sexo (chi-cuadrado= 0,629, $p = 0,428$) (Figura 21)

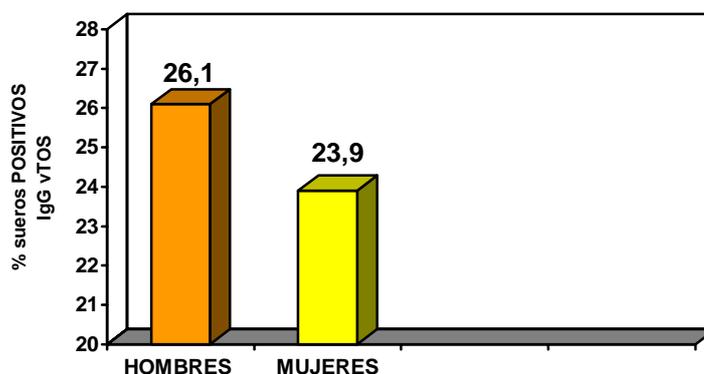


Figura 21. Distribución de la prevalencia de infección por virus Toscana en la provincia de Granada atendiendo al sexo

En cuanto a la seroprevalencia en las distintas áreas geográficas (Fig. 22) no existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan conjuntamente (chi-cuadrado= 5,690; p=0,224).

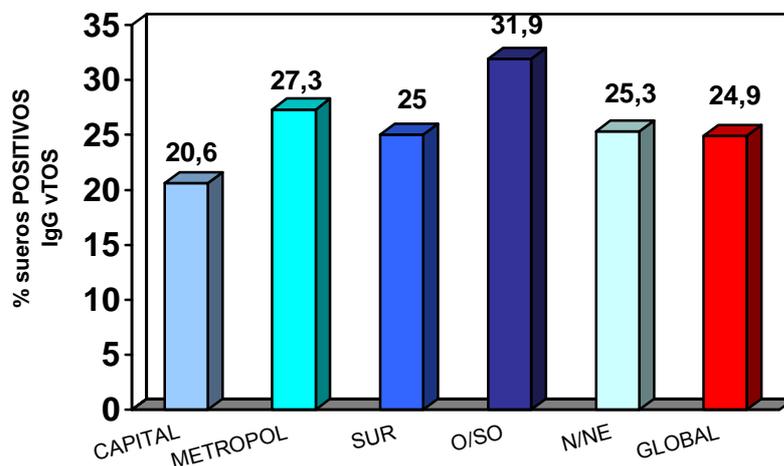


Figura 22. Distribución de la prevalencia de infección por virus Toscana en la provincia de Granada atendiendo a la localización geográfica

Sin embargo, cuando se comparan la seroprevalencia de la población urbana de la capital (20,6%) con la seroprevalencia del resto de las áreas de la provincia que son básicamente rurales (26,7%), si se hallan diferencias significativas (chi-cuadrado= 4,136; p<0,05). En el grupo de edad de mayores de 65 años del área urbana se encontró una seroprevalencia del 44,1%, significativamente menor que el 66% hallado en ese mismo grupo de las zonas rurales (chi-cuadrado=5,082; p<0,05). En el resto de grupos de edad, a pesar de que la seroprevalencia es casi siempre menor en la capital, no existen diferencias estadísticamente significativas al compararlos con la población rural (Fig. 23).

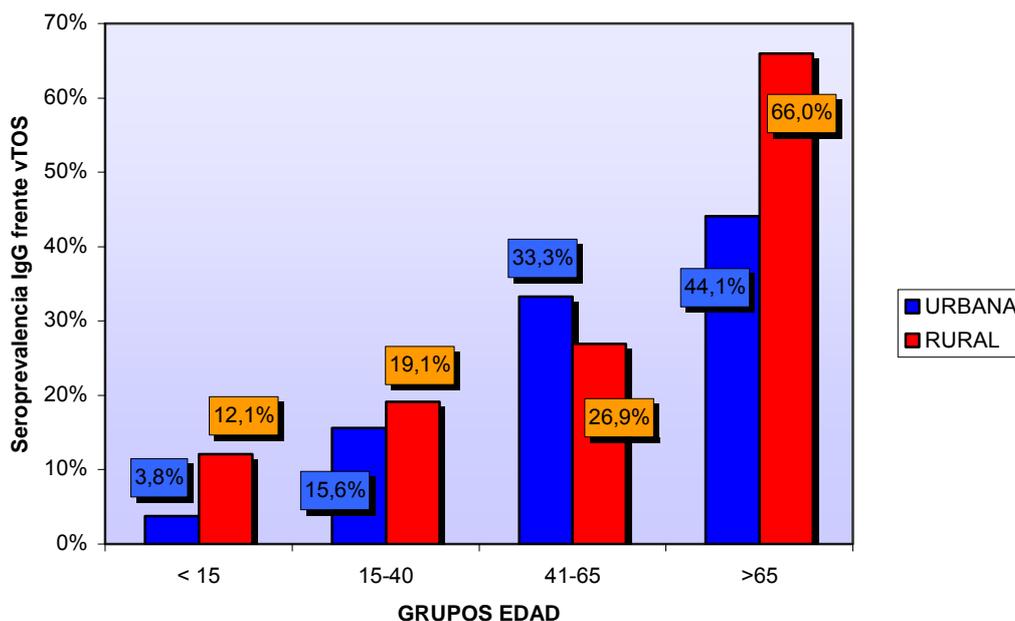


Figura 23. Seroprevalencia por grupos de edad en la población urbana (capital) y en la población rural (el resto de las áreas geográficas de la provincia)

IV.2. ESTUDIO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA

Desde enero de 1988 a febrero de 2005 se procesaron en el laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada 895 LCRs, procedentes de otros tantos pacientes con sospecha de infección neurológica de etiología vírica.

En 275 de las muestras (30,7 % del total) se detectó algún virus por cultivo y/o biología molecular. La distribución de los diferentes virus identificados se muestra en figura 24.

El virus más frecuente ha sido enterovirus (n=217, 78,9 % del total de aislados), seguido de parotiditis (n=21, 7,6 % del total de aislados).

Virus Toscana (vTOS) se aisló en 19 muestras, lo que supuso el 7% de los virus aislados. Todos los aislamientos se realizaron en células Vero, con un tiempo medio de detección de ECP de 6 días (rango 4-10 días).

VIRUS	n
<i>Enterovirus</i>	217
<i>Parotiditis</i>	21
<i>Toscana</i>	19
<i>VVZ</i>	8
<i>VHS</i>	6
<i>Adenovirus</i>	3
<i>Parainfluenza</i>	1

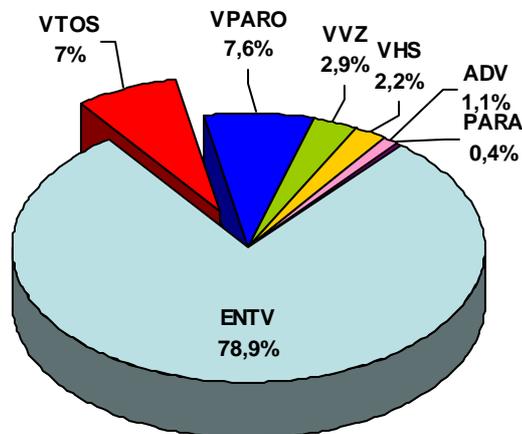


Figura 24. Virus detectados en procesos neurológicos en Hospital Universitario Virgen de las Nieves desde el año 1988 a 2005.

Las características demográficas de los pacientes en los que se aisló vTOS, así como fecha de aislamiento se muestran en tabla 6.

El mayor número de aislamientos se produjo en varones (n=13; 68,4%). En general se trató de adultos jóvenes (edad media: 28 años, rango: 10-64 años). Sólo dos pacientes fueron mayores de 40 años, y no se detectó vTOS en menores de 10 años. Mayoritariamente los pacientes procedían del medio rural (n=12; 63,2%), habitando en pueblos pertenecientes a la provincia de Granada. En ningún caso existía antecedente de viajes a otras regiones en las 2 semanas previas al diagnóstico. Todos los casos se presentaron entre junio y octubre, siendo agosto el mes de mayor incidencia con 9 casos (47,4 %). Fuera de los meses de julio (n=4; 21,1%) y agosto, se detectaron 6 casos: uno en junio (5,2%), tres en septiembre (15,8%) y dos en octubre (10,5%).

Tabla 6. Características demográficas de los 19 pacientes con infección neurológica en los que se aisló virus Toscana del LCR en Granada desde 1988 a 2004

Nº caso	Sexo*	Edad (años)	Fecha detección		Hábitat
			vTOS en LCR	Clínica	
1	M	29	Agosto-1988	meningitis	Urbano
2	V	64	Agosto-1988	meningitis	Rural
3	V	29	Agosto-1988	meningitis	Urbano
4	M	18	Junio-1990	meningitis	Urbano
5	M	36	Julio-1990	meningitis	Urbano
6	M	23	Julio-1990	meningitis	Rural
7	V	24	Julio-1991	meningitis	Rural
8	V	10	Agosto-1991	meningitis	Rural
9	M	28	Septiembre-1991	meningitis	Rural
10	V	13	Agosto-1992	meningitis	Urbano
11	M	19	Agosto-1992	meningitis	Rural
12	V	22	Octubre-1992	meningitis	Rural
13	V	29	Agosto-1998	meningitis	Rural
14	V	34	Septiembre-1998	meningitis	Rural
15	V	32	Junio-2001	meningitis	Urbano
16	V	26	Agosto-2001	meningitis	Urbano
17	V	39	Agosto-2002	meningitis	Rural
18	V	30	Octubre-2003	meningitis	Rural
19	V	45	Septiembre-2004	meningoencefalitis	Rural

Los datos clínicos y parámetros analíticos se muestran en tabla 7. En todos los enfermos el diagnóstico fue de meningitis linfocitaria. El síntoma más frecuente fue la cefalea holocraneal o focalizada en el 100% de enfermos. La fiebre mayor de 37,5°C se dio en el 89,5% de pacientes, en ningún caso superior a 39°C. La duración media de la fiebre fue de 48 horas (rango: 18h a 5

días). Se registraron náuseas y/o vómitos en el 84,2% de los pacientes y sólo el 52,6% de los mismos presentó rigidez de nuca en la exploración inicial.

En casi todos los casos, salvo en uno, la evolución fue buena, con una duración media del cuadro de 7 días (rango: 3-10 días) y en el seguimiento posterior no se detectaron secuelas neurológicas en ningún paciente.

Con respecto a las pruebas complementarias, el 100% de los pacientes tenían pleocitosis en LCR (rango 20-1320 leucocitos/mm³) con predominio linfocitario en todos los casos. En 14 pacientes (73,7%) el recuento de leucocitos en LCR fue ≤ 50 leucocitos /mm³. Se detectó proteinorraquia elevada ($>0,4$ g/l) en el 61,1% de los pacientes en los que se realizó la prueba (11 de 18), con unos valores de 0,3 a 7 g/l. Los valores de glucosa en LCR fueron siempre normales. En sangre, sólo en el 26,3% de los enfermos hubo discreta leucocitosis y un enfermo presentó leucopenia.

Tabla 7. Sintomatología y parámetros clínicos predominantes de los 19 pacientes en que se ha aislado virus Toscana en Granada desde 1988 a 2005.

Datos clínicos y analíticos	n	%
Fiebre $>37,5^{\circ}\text{C}$	17	89,5
Cefalea	19	100
Rigidez de nuca	10	52,6
Náuseas y/o vómitos	16	84,2
Pleocitosis en LCR >10 células/mm ³	19	100
Glucosa en LCR normal (40-70 mg/dL)	19	100
Proteínas en LCR normales (20-40 mg/dL)	7	36,8
Leucocitosis	5	26,3
Leucopenia	1	5,3

El caso nº 19 merece mención aparte por tratarse de una infección neurológica persistente por vTOS, situación que hasta la fecha no ha sido descrita en la literatura.

De forma resumida, se trató un varón de 45 años de edad, procedente de una zona rural de la provincia de Granada, esplenectomizado a causa de un traumatismo, trasplantado renal por insuficiencia renal crónica secundaria a una sepsis meningocócica y en tratamiento crónico con inmunosupresores (ciclosporina 85 mg/día, micofenolato mofetilo 1250 mg/día y prednisona 60 mg/día), que ingresó en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada el 27 de septiembre de 2004 con un síndrome febril (39°C) de cuatro días de evolución, cefalea holocraneal y síndrome confusional agudo.

En el TAC craneal se hallaron hipodensidades en la sustancia blanca de ambos lóbulos temporales. La resonancia magnética (RM) de encéfalo muestra lesiones hiperintensas en T2 en sustancia blanca subcortical, que no se modifican con el contraste.

Al ingreso se envió LCR para estudio microbiológico completo, que incluyó bacterias habituales, micobacterias, hongos y virus, y en el que de forma exclusiva se detectó vTOS mediante cultivo en células Vero y por RT-PCR

Tras una mejoría clínica inicial, 12 días después del ingreso, el paciente presentó una crisis tónico-clónica generalizada, deterioro cognitivo importante. cuadro ictal hemisférico izquierdo con disfasia, disartria y paresia de miembro inferior derecho y poco reactivo a los estímulos externos. Se repiten los estudios de neuroimagen, observándose una leucoencefalopatía fronto-parietal bilateral de probable origen vasculítico, tras lo cual se inicia tratamiento con prednisona a altas dosis. Ante la favorable respuesta clínica el paciente es finalmente dado de alta el 30 de noviembre de 2004.

Durante el ingreso del paciente se realizaron periódicamente extracciones de LCR para control analítico evolutivo, además de los realizados en el LCR tomado al ingreso, se realizó estudio microbiológico completo en otro líquido extraído un mes después, en el que se volvió a detectar como único patógeno vTOS, tanto por cultivo en células Vero como por RT-nested-PCR (Tabla 8).

Tabla 8. Datos analíticos de las muestras de LCR del caso nº 19 de infección neurológica por virus Toscana

Fecha obtención	Glucosa mg/dl	Proteínas mg/dl	Leucocitos /mm³	% linfocitos	PCR y cultivo vTOS
29/09/04	50	733	288	100	POSITIVO
1/10/04	67	647	355	97	ND
11/10/04	43	239	251	98	ND
21/10/04	60	264	110	100	ND
27/10/04	49	214	60	100	POSITIVO
18/11/04	52	228	51	100	ND

ND: no determinado

Por otro lado, se estudiaron muestras de sueros de fases aguda (tomado al ingreso) y convalecientes (tomados a los 10 días del ingreso y cinco meses después) para detección de IgM e IgG frente a virus Toscana. En el suero de fase aguda no se detectaron anticuerpos específicos frente a virus Toscana, sin embargo en los sueros obtenidos a los 10 días y a los 5 meses del ingreso, la IgM positivizó, manteniéndose la IgG negativa en el segundo suero y en la zona gris (débil/dudoso) en el último (Tabla 9 y Figura 25).

Para confirmar la especificidad de la seroconversión observada frente a vTOS se realizó una prueba de neutralización en placa microtíter en la que se enfrentaron diluciones de los tres sueros (fase aguda y los dos de fase convaleciente) a 25 TCDI₅₀ de una cepa de vTOS. Sólo se observó actividad neutralizante a título 1:160 en el suero que se obtuvo a los cinco meses.

Tabla 9. Serología frente a virus Toscana

Fecha obtención suero	IgM (ratio DO/CO)	IgG (ratio DO/CO)
29/09/04 SFA	NEGATIVA (0,127)	NEGATIVA (0,163)
07/10/04 SFC	POSITIVA (1,220)	NEGATIVA (0,476)
08/03/05 SFC	POSITIVA (2,018)	DÉBIL/DUDOSA (0,815)

SFA: suero fase aguda; SFC: suero fase convaleciente; ratio DO/CO: ratio absorbancia de la muestra/absorbancia punto de corte. (Si el ratio es mayor de 1,2 la muestra se considera positiva, si el ratio es menor de 0,8 la muestra es negativa).

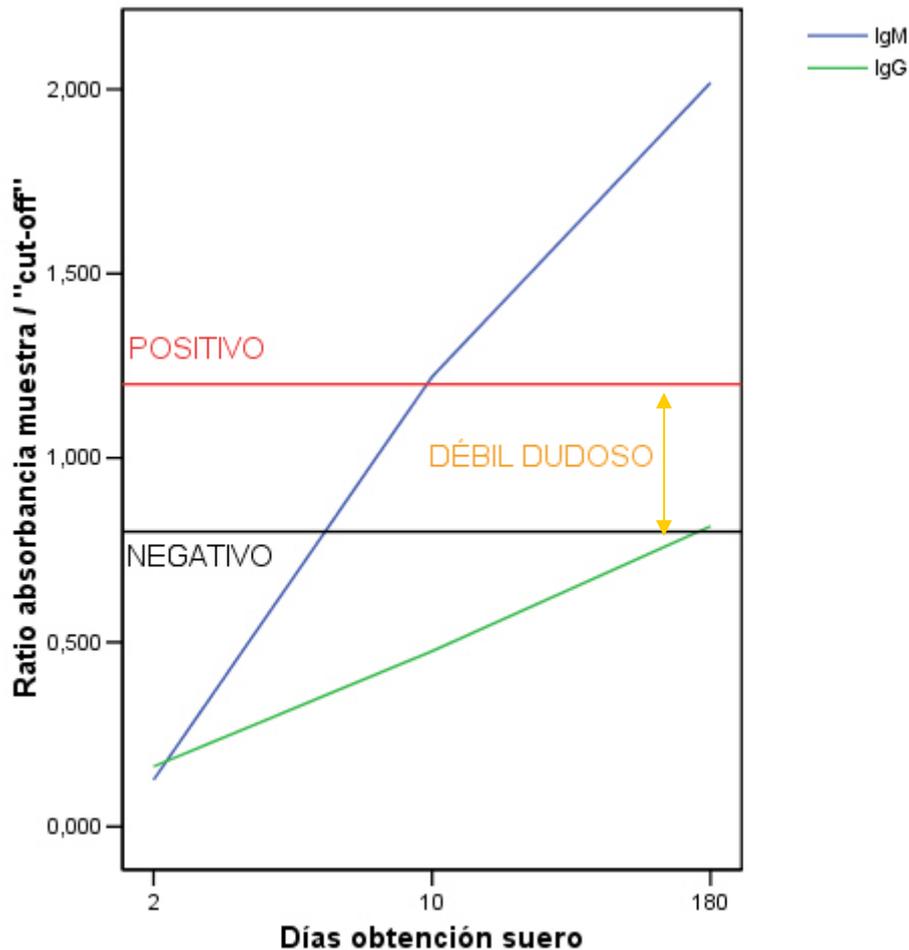


Figura 25. Evolución de la respuesta serológica frente a vTOS. Caso nº 19

IV.3. IDENTIFICACIÓN DE VECTORES DE VIRUS TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA

Durante el año 2003 se realizó trapeo en 10 ocasiones realizándose 2192 capturas, 1110 de machos para estudio microscópico de caracterización morfológica y clasificación por especies y 1082 hembras que se separaron en 22 lotes para detección de *Phlebovirus* mediante RT-PCR. De los machos estudiados, 1087 pudieron clasificarse a nivel de especie.

En la temporada 2004 se realizó trapeo en 15 ocasiones, capturándose 6030 ejemplares, 3026 hembras que se distribuyeron en 42 lotes

y 2824 machos en 39 lotes. En esta temporada se utilizaron para detección de *Phlebovirus* tanto hembras como machos, procesándose para cultivo de virus y RT-PCR un total de 81 lotes, y utilizándose para clasificación por especies una muestra representativa de los individuos capturados en cada localización.

En la tabla 10 y en la figura 26 se muestran las frecuencias de cada una de las especies de flebotomos halladas.

La especie más frecuentemente detectada en nuestro medio ha sido *Phlebotomus perniciosus* (68,7 % del total).

Tabla 10. Clasificación por especies de los flebotomos capturados durante 2003-2004 en la provincia de Granada

ESPECIE	Nº FLEBOTOMOS (%)*		
	2003	2004	TOTAL
<i>P. perniciosus</i>	764 (68,8)	191 (68,2)	955 (68,7)
<i>P. sergenti</i>	87 (7,8)	11 (3,9)	98 (7,1)
<i>P. papatasi</i>	58 (5,2)	21 (7,5)	79 (5,7)
<i>P. ariasi</i>	5 (0,5)	2 (0,7)	7 (0,5)
<i>P. sp</i>	23 (2,1)	0 (0)	23 (1,7)
<i>S. minuta</i>	173 (15,6)	55 (19,6)	228 (16,4)

* En la temporada 2003 se clasificaron todos los flebotomos machos capturados; en 2004 una muestra representativa de los individuos capturados, machos y hembras.

En dos de los lotes de hembras capturadas durante el año 2003 se detectaron *Phlebovirus*, que tras secuenciar los fragmentos del genoma amplificados con PCR no se correspondían con virus Toscana (tabla 11). Como se observa en tabla 6 en las dos localizaciones de procedencia de los lotes con *Phlebovirus*, Alfacar y Viznar, la especie predominante fue *P. perniciosus* (96,3% y 83,8% respectivamente) (tabla 12).

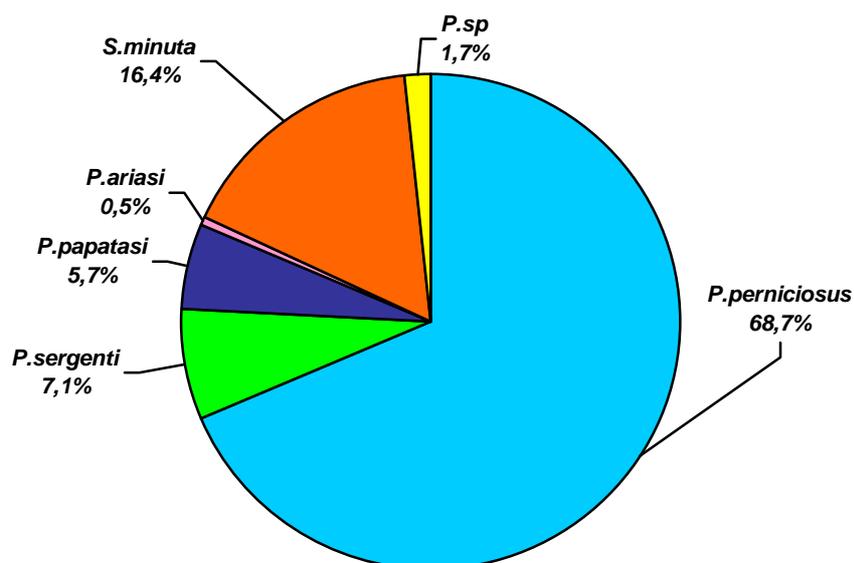


Figura 26. Distribución por especies de los flebotomos capturados en la provincia de Granada durante las temporadas 2003 y 2004

En cinco de los lotes de flebotomos capturados en el año 2004 se consiguió aislar *Phlebovirus* en cultivo celular. Dos de los cinco *Phlebovirus* aislados se identificaron como vTOS mediante RT-PCR y posterior secuenciación de los amplicones (Tabla 13).

Tabla 11. Detección de *Phlebovirus* mediante RT-PCR secuencial en lotes de flebotomos hembras capturados en la provincia de Granada en año 2003

Nº LOTE	SEXO	FECHA CAPTURA	LOCALIZACIÓN	RESULTADO
GR015	HEMBRA	14/08/03	VIZNAR	PHLEBOVIRUS
GR018	HEMBRA	14/08/03	ALFACAR	PHLEBOVIRUS

Tabla 12. Clasificación por especies de los flebotomos machos capturados en las mismas localizaciones y fecha (15/08/2003) en las que se detectó *Phlebovirus* por RT-PCR.

ESPECIE	Nº INDIVIDUOS (%)	
	ALFACAR	VIZNAR
<i>P. perniciosus</i>	44 (93,6)	62 (83,8)
<i>P. sergenti</i>	0 (0)	1 (1,4)
<i>P. papatasi</i>	0(0)	2 (2,7)
<i>P. ariasi</i>	0(0)	1 (1,4)
<i>S. minuta</i>	3 (6,4)	8 (10,8)
TOTAL	47 (100)	74 (100)

Tabla 13. *Phlebovirus* aislados en cultivo celular a partir de lotes de flebotomos capturados en la provincia de Granada durante el año 2004

Nº LOTE	SEXO	FECHA CAPTURA	LOCALIZACION	RESULTADO
GR025	Hembra	22/06/04	Alfacar	PHLEBOVIRUS
GR040	Hembra	14/07/04	Víznar	TOSCANA
GR041	Macho	14/07/04	Víznar	TOSCANA
GR082	Macho	07/09/04	Alfacar	PHLEBOVIRUS
GR087	Macho	07/09/04	Granada	PHLEBOVIRUS

En cuanto a los resultados de las RT-PCR realizadas en los lotes de flebotomos capturados en el año 2004, se detectaron Phlebovirus en 9 lotes más, identificándose uno de ellos como vTOS (Tabla 14). Todos los lotes que fueron positivos en cultivo celular lo fueron también por PCR.

Tabla 14. *Phlebovirus* detectados sólo mediante RT-PCR secuencial en los lotes de flebotomos capturados en 2004 en la provincia de Granada

Nº LOTE	SEXO	FECHA CAPTURA	LOCALIZACIÓN	RESULTADO
GR029	Macho	30/06/04	Víznar	PHLEBOVIRUS
GR036	Hembra	30/06/04	Jun	PHLEBOVIRUS
GR044	Hembra	21/07/04	Víznar	PHLEBOVIRUS
GR047	Hembra	21/07/04	Víznar	PHLEBOVIRUS
GR049	Macho	21/07/04	Víznar	PHLEBOVIRUS
GR52	Hembra	21/07/04	Alfacar	PHLEBOVIRUS
GR65	Hembra	11/08/04	Víznar	PHLEBOVIRUS
GR79	Hembra	07/09/04	Alfacar	TOSCANA
GR98	Macho	21/09/04	Alfacar	PHLEBOVIRUS

En total se detectaron *Phlebovirus* en 16 lotes de los 103 procesados, de los que tres de ellos se identificaron como vTOS. Los *Phlebovirus*, incluido vTOS, se detectaron tanto en lotes de flebotomos machos (6 lotes, 1 vTOS) como de hembras (10 lotes, 2 vTOS), teniendo en cuenta que durante la temporada 2003 sólo se procesaron para detección de *Phlebovirus* las hembras.

La tasa de infección por *Phlebovirus* en los flebotomos fue del 0,3% (IC 95%: 0,14-0,44), y la de vTOS fue del 0,05% (IC 95%:0,1-0,009).

En la tabla 15 se muestra un resumen de los datos de todos los lotes de flebotomos que fueron positivos durante ambas temporadas mediante cultivo celular y/o RT-PCR secuencial.

No hay datos de las especies de flebotomos de la captura del 14/07/2004 en Víznar en la que se detectó vTOS en dos lotes. En la captura del 07/09/2004 en Alfacar, en la que también hubo un lote con vTOS, sólo se halló *P.perniciosus* (93,4%) y *S. minuta* (6,6%).

Tabla 15. Lotes de flebotomos en los que se aisló y/o detectó Phlebovirus mediante RT-PCR y/o cultivo durante las temporadas 2003 y 2004

Nº LOTE	FECHA CAPTURA	LOCALIZACIÓN	SEXO	Nº indiv/ lote	PCR	CULTIVO	VIRUS DETECTADO
GR015	14/08/03	Víznar	♀	100	P	ND	PHLEBOVIRUS
GR018	14/08/03	Alfacar	♀	49	P	ND	PHLEBOVIRUS
GR025	21/06/04	Alfacar	♀	34	P	P	PHLEBOVIRUS
GR029	30/06/04	Víznar	♂	82	P	N	PHLEBOVIRUS
GR036	30/06/04	Jun	♀	73	P	N	PHLEBOVIRUS
GR040	14/07/04	Víznar	♀	61	P	P	TOSCANA
GR041	14/07/04	Víznar	♂	100	P	P	TOSCANA
GR044	21/07/04	Víznar	♀	100	P	N	PHLEBOVIRUS
GR047	21/07/04	Víznar	♀	81	P	N	PHLEBOVIRUS
GR049	21/07/04	Víznar	♂	100	P	N	PHLEBOVIRUS
GR052	21/07/04	Alfacar	♀	100	P	N	PHLEBOVIRUS
GR065	11/08/04	Víznar	♀	95	P	N	PHLEBOVIRUS
GR079	07/09/04	Alfacar	♀	100	P	N	TOSCANA
GR082	07/09/04	Alfacar	♂	100	P	P	PHLEBOVIRUS
GR087	07/09/04	Granada	♂	77	P	P	PHLEBOVIRUS
GR098	21/09/04	Alfacar	♂	100	P	N	PHLEBOVIRUS

IV.4. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS CEPAS DE VIRUS TOSCANA AISLADOS EN LA PROVINCIA DE GRANADA

Como se observa en la secuencia de bases de la región del segmento L amplificada, tanto la cepa aislada en el paciente con meningitis (P03), caso n° 18, como las aisladas de tres lotes de flebotomos en 2004 (GR40, GR41, GR79), muestran una diferencia en la secuencia de bases de un 16-17% con respecto a la cepa de vTOS italiana (Tos) ISS.Phl.3 (número de acceso en GenBank X68414). Sin embargo, la homología entre las cepas españolas, tanto de humanos como de flebotomos, es superior al 98% (Figura 27). En el árbol filogenético por se situarían muy cerca del resto de las cepas de vTOS aisladas de pacientes con meningitis en Granada en años anteriores y secuenciadas previamente en el Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Emergentes del Centro Nacional de Microbiología (Figura 28)

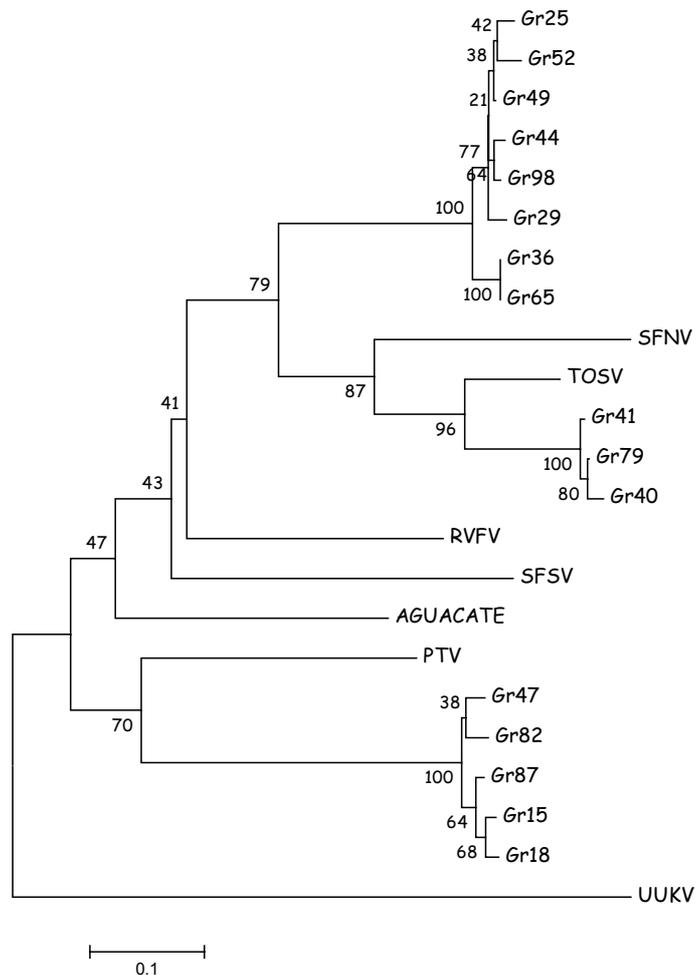
Figura 27. Secuencias de los fragmentos del segmento L amplificados de las cepas de VTOS detectadas en flebotomos de la provincia de Granada comparándola con la cepa de vTOS italiana

Tos	TTGTCAAAAATCCCAAAAGTGCTCAGGTCTGAGCTACAAGTATTTCTAACCACAGGCTA	60
Gr40	TTGTCAAAGACCCCAAAAGTGCTCAGATCTGAGTTGCAAGTATTTCTTACTCATAGATTG	60
Gr41	TTGTCAAAGATCCCAAAAGTGCTCAGATCTGAGTTGCAAGTATTTCTTACTCACAGATTG	60
Gr79	TTGTCAAAGATCCCAAAAGTGCTCAGATCTGAGTTGCAAGTATTTCTTACTCATAGATTG	60
P03	CTGTCAAAGATCCCAAAAGTGCTCAGATCTGAGTTGCAAGTATTTCTTACTCATAGATTG	60
Tos	TTCAGCACAATGCAGCGAATATCAGCCACCCCTTTCCAGCTCCACAAGGTAGGAGGGAAC	120
Gr40	TTCAACACAATGCAGAGGATTTTCAGCCACTCCATTCCAGCTTCATAAAGTTGGTGGAAAC	120
Gr41	TTCAACACAATGCAGAGGATTTTCAGCCACTCCATTCCAGCTTCATAAAGTTGGTGGAAAT	120
Gr79	TTCAACACAATGCAGAGGATTTTCAGCCACTCCATTCCAGCTTCATAAAGTTGGTGGAAAT	120
P03	TTCAACACAATGCAGAGGATTTTCAGCCACTCCATTCCAGCTTCATAAAGTTGGTGGAAAC	120

Tos ATCCGCTGGAAGGGACTTTTCAATCCTTACTCTGGAAACAGTATTGATGAGCTGCAGACT 180
Gr40 ATCCGTTGGAAGGGGCTTTTCAATCCATACTCCGGAAATAGCATTGATGAGCTACAAACT 180
Gr41 ATCCGTTGGAAGGGGCTTTTCAATCCGTACTCCGGAAATAGTATTGATGAGCTACAAACT 180
Gr79 ATCCGTTGGAAGGGGCTTTTCAATCCGTACTCCGGTAATAGCATTGATGAGCTACAAACT 180
P03 ATCCGTTGGAAGGGGCTTTTCAATCCATACTCCGGAAATAGCATTGATGAGCTACAAACT 180

Tos TTAATTAGCTGCTGCTATAAT 201
Gr40 TTGATCAGCTGCTGCTACAAT 201
Gr41 TTGATCAGCTGCTGCTACAAT 201
Gr79 TTGATCAGCTGCTGCTACAAT 201
P03 TTGATCAGCTGCTGCTACAAT 201

Figura 28. Árbol filogenético de las cepas de *Phlebotivirus* detectadas en flebotomos



V. DISCUSIÓN

V.1. SEROPREVALENCIA FRENTE A VIRUS TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA

Estudios seroepidemiológicos previos demuestran la existencia de una alta tasa de anticuerpos anti-vTOS en nuestro país en la población general que se incrementan con la edad de la población estudiada (Mendoza-Montero y cols, 1998), (Echevarría y cols, 2003) y aunque las muestras de dichos estudios no estaban suficientemente estratificadas para ser un fiel reflejo de la población general y en algunos se usaron técnicas poco estandarizadas, sus resultados sugieren que vTOS puede ser endémico en algunas regiones de nuestro país y por tanto el riesgo de infección se incrementaría con el mayor número de exposiciones al posible vector, lo que coincide plenamente con los resultados obtenidos en nuestro estudio: prevalencia global alta (24,9%), mucho mayor en adultos que en niños (60,4% en mayores de 65 años frente al 9,4% en menores de 15 años).

Estos resultados son similares a los publicados en otras regiones del área mediterránea donde vTOS se ha demostrado como patógeno humano, así Valassina y colaboradores en 2003 observaron una prevalencia de anticuerpos anti vTOS del 22,7% en la población del área urbana de Siena, mientras que entre trabajadores forestales y población más expuesta la seroprevalencia aumentaba hasta el 77,2%. En un estudio anterior realizado por Eitrem y colaboradores en 1991, obtienen una prevalencia de anticuerpos frente a vTOS del 20% entre la población de Chipre. Estos resultados contrastan con la baja seroprevalencia hallada en áreas no endémicas, como Alemania, en la que entre un 0,7% y un 1,6% de la población presentan anticuerpos frente a vTOS, población que probablemente fue infectada durante un viaje a zonas endémicas del Mediterráneo (Schwarz y cols, 1995).

Hay numerosos casos descritos en la literatura de turistas o soldados, que tras una estancia en zonas endémicas padecen una meningitis-meningoencefalitis por vTOS (Ehrnst y cols, 1985; Calisher y cols, 1987; Eitrem y cols, 1991; Schwarz y cols, 1993; Dobler y cols, 1997). Estas comunicaciones

junto con la alta seroprevalencia y escasa repercusión clínica entre la población local, concuerda con infecciones producidas por un virus cuya existencia en nuestro medio no es reciente, y frente al que existiría una cierta inmunidad natural en humanos expuestos al mismo y donde las infecciones más graves tienden a producirse en personas que visitan circunstancialmente zonas de alta prevalencia provenientes de áreas geográficas donde no circula el virus o lo hace de forma escasa. También sugiere un alto porcentaje de infecciones asintomáticas o de sintomatología anodina, produciéndose los procesos neurológicos sintomáticos sólo en un porcentaje mínimo de las personas infectadas. Dado que hay pocos casos descritos de meningitis/meningoencefalitis en niños, puede ser que cuando la primoinfección ocurre durante la infancia, las manifestaciones clínicas sean más leves o incluso asintomáticas, viéndose influenciada la severidad de la infección por la edad a la que se adquiere, como ocurre con otros *Phlebovirus* (Tesh y cols, 1976). Por tanto, el papel de vTOS como patógeno humano está por determinar, haciéndose necesarios estudios en población general y atención primaria para determinar la implicación real de vTOS en otro tipo de patologías menos graves y que no requieran ingreso hospitalario, como sucede con virus Nápoles y Sicilia con los que está emparentado.

V.2. IMPLICACIÓN DE VIRUS TOSCANA EN CUADROS NEUROLÓGICOS EN LA PROVINCIA DE GRANADA

La infección humana por virus transmitidos por picadura de flebotomos es conocida desde la década de los cuarenta (Beaty y Calisher, 1991) tratándose en general de procesos febriles de comienzo agudo, autolimitados y con duración aproximada de 3-5 días y con máxima incidencia en verano. En el área mediterránea, tres han sido los serotipos de *Phlebovirus* que más frecuentemente se han asociado a estos cuadros: virus Nápoles, Sicilia vTOS. Desde al año 1980 (Nicoletti y cols, 1991) vTOS se viene implicando como agente responsable de cuadros de infección aguda del SNC, principalmente

meningitis y ocasionalmente meningoencefalitis; habiéndose publicado datos en este sentido en Italia (Calisher y cols, 1987; Braito y cols, 1998; Valassina y cols, 1998), Portugal (Ehrnst y cols, 1985), Chipre (Eitrem y cols, 1990), Francia (Hemmersbach-Miller y cols, 2004) y recientemente en España, particularmente en Granada, donde desde 1988 se viene detectando vTOS en pacientes con meningitis (Mendoza J 1998, Navarro JM 2004), así como por estudios serológicos en Madrid (Echevarría y cols, 2003) y en un turista sueco tras regresar de un viaje por Cataluña (Eitrem y cols, 1991).

En este trabajo hemos presentado la serie completa de enfermos con meningitis en los que se ha aislado vTOS en la provincia de Granada hasta final del año 2004, observándose que se trata de un proceso meníngeo poco grave, autolimitado, sin secuelas, que afecta fundamentalmente a adultos jóvenes que desarrollan su actividad fundamentalmente en ambiente rural. Solamente un caso de los 19 descritos se ha presentado como una meningoencefalitis grave, con persistencia del virus en el LCR un mes después del debut de la enfermedad. El precario estado inmunológico del paciente podría explicar la gravedad de la infección, así como el retardo sufrido en la respuesta serológica, en la que la IgM sólo se detectó a partir del décimo día de ingreso hospitalario, y la neutralización frente a vTOS sólo fue positiva, con un título de 1:160, en el suero obtenido cinco meses después del inicio de la enfermedad.

Dado que diferentes especies de flebotomos están presentes en todas las regiones ribereñas del Mediterráneo, tanto en el sur de Europa como en el Norte de África (Abonnenc, 1972), cabe la posibilidad de que en cualquiera de estas zonas geográficas puedan darse infecciones por *Phlebovirus*. En España se ha detectado flebotomos en la mayoría de las Comunidades Autónomas (Gil Collado y cols, 1989). Por tanto, sería necesario realizar más estudios para establecer la importancia real de la infección por vTOS en procesos neurológicos en otras áreas geográficas de nuestro país.

La mayor circulación de flebotomos en nuestro medio se produce en los meses cálidos (Morillas Márquez y cols, 1983; Gil Collado y cols, 1989; Morillas

Márquez, 1991), y es en estos periodos cuando mayor riesgo de infección por *Phlebovirus* existe, lo que coincide con nuestros resultados ya que de hecho el 47,4% de los pacientes estudiados contrajeron la enfermedad en el mes de agosto y el 66,5% entre julio y agosto.

El presente trabajo pone de manifiesto la existencia de infección por vTOS en nuestro medio, y por tanto, la necesidad de incluirlo entre los agentes responsables de cuadros neurológicos agudos, fundamentalmente meningitis aséptica y sobre todo durante los meses de verano. En nuestro estudio supone el 7% de las infecciones SNC virales en las que se detectó el agente etiológico.

En otras regiones de seroprevalencia de infección por vTOS similar a la nuestra, en los meses de verano, vTOS se llega a aislar en el 50% de las infecciones neurológicas en los que se sospecha etiología viral (Valassina y cols, 1998), y hasta en un 30% de los casos si se consideran los cuadros neurológicos víricos de todo el año (Nicoletti y cols, 1991). En algunos estudios, el diagnóstico se realiza por serología (Nicoletti y cols, 1991), que es más sensible que el cultivo en líneas celulares, pero también más inespecífico. La menor incidencia de infecciones neurológicas por vTOS en nuestro medio podría explicarse por un menor poder patógeno de las cepas de vTOS que circulan en nuestro entorno, por un lado, y por otro a que hasta junio de 2003 no utilizamos las técnicas moleculares, más sensibles que el cultivo para detectar vTOS en LCR (Valassina y cols, 2000) y que si se han utilizado en algunos de esos estudios.

Por tanto, cabe la posibilidad de que el papel de VTOS en cuadros neurológicos en nuestro medio esté infravalorado, y probablemente se tendrían datos más objetivos con la utilización conjunta de las diferentes técnicas que en la actualidad existen para llegar al diagnóstico de la infección por vTOS: cultivo en células Vero, determinación serológica de IgM específica, o seroconversión de IgG, para la que existen reactivos comerciales (Soldateschi y cols, 1999), o por RT-PCR del ARN viral (Schwarz y cols, 1995; Valassina y cols, 1996; Valassina y cols, 2002; Sánchez Seco y cols, 2003), teniendo en cuenta la posibilidad de resultados negativos, como se sugiere en el trabajo

realizado por Sanchez-Seco y cols tras el análisis genético de alguna de las primeras cepas de vTOS aisladas en Granada (Sánchez Seco y cols, 2003).

V.3. VECTORES DE VIRUS TOSCANA EN LA PROVINCIA DE GRANADA

El ciclo biológico de vTOS en nuestro medio es desconocido. En general, se han descrito diferentes especies de flebotomos como vectores de transmisión de estos virus, así *P. papatasi* es un vector comprobado en la transmisión de virus Nápoles y Sicilia (Tesh, 1988) y *P. perniciosus*, en la transmisión de vTOS (Ciufolini y cols, 1985). No obstante la asociación entre los distintos flebovirus y los vectores puede ser diferente según el área geográfica de que se trate (Verani y cols, 1988), siendo por tanto interesante conocer en cada área donde se detecte infección por estos virus cuáles serían los posibles vectores para articular medidas de control adecuadas (Alexander y Maroli, 2003).

En este trabajo demostramos que el vector más probable de vTOS en nuestra provincia es *P. perniciosus*, ya que es la especie más frecuente en nuestro medio, representando el 68,7% de los flebotomos capturados. Por otro lado, los flebotomos de la captura del 7 de septiembre de 2004 en Alfacar, rindieron como única especie del género *Phlebotomus*, *P. perniciosus*. En cuanto al 6,6% de *S. minuta* que se halló en esa captura, se trata de una especie herpetófila, con preferencia a alimentarse sobre reptiles y que raramente pica al hombre. En España no se ha descrito hasta el momento la presencia de *P. perfiliewi*, la otra especie de la que se ha aislado vTOS en Italia. Se ha conseguido de manera experimental infectar por vía transtorácica y oral *P. perniciosus* con vTOS, y sin embargo, cuando se trata de infectar *P. papatasi* con vTOS, éste desaparece rápidamente de los flebotomos, sin lograr que el virus se multiplique en el insecto (Ciufolini y cols, 1985). De la misma

manera, cuando se trata de infectar *P. perniciosus* con otro *Phlebovirus* como Nápoles tampoco se consigue (Ciufolini y cols, 1985).

Se ha aislado vTOS tanto en flebotomos hembras (2 lotes) como en machos (1 lote), corroborando los resultados de estudios similares (Verani y cols, 1988). El aislamiento de vTOS en flebotomos machos y hembras indica que existe una transmisión vertical del virus, ya que sólo la hembra es hematófaga, y por tanto la única que puede infectarse al picar. Tesh y Modi demostraron la transmisión transovárica de vTOS en una colonia de *P.perniciosus* durante 13 generaciones. Sin embargo, la tasa de infección iba disminuyendo en cada generación, por lo que vTOS no podría mantenerse solamente de esta manera (Tesh y Modi, 1987). Un mecanismo de amplificación posible para vTOS en ausencia de un hospedador virémico sería la transmisión sexual entre flebotomos. Tesh y colaboradores diseñaron un estudio experimental con una colonia de *P.perniciosus* Newstead, en el que obtienen una tasa de transmisión venérea de vTOS del 4,5%. En este mismo experimento vTOS se detecta en todas las fases de desarrollo de los flebotomos, independientemente de la temperatura a la que se incuben (Tesh y cols, 1992), lo que sugiere que vTOS podría sobrevivir durante el invierno en algún estadio larvario del flebotomo.

Se desconoce si existe algún reservorio vertebrado de vTOS, ya que hasta el momento sólo se ha descrito el aislamiento de vTOS en el cerebro de un murciélago (Verani y cols, 1988). No obstante no sabemos si estos son los únicos medios de supervivencia del virus en periodos interepidémicos, por lo que serían necesarios más estudios que permitan establecer los mecanismos mediante los cuales vTOS se mantiene y sobrevive.

En nuestro estudio, la tasa de infección por vTOS en los flebotomos de Granada es de un 0,05%, inferior a la tasa del 0,2% descrita en flebotomos de Toscana (Verani y cols, 1988). Esta baja tasa de infección, a pesar de que las tasas de seroprevalencia en humanos son similares, tanto en Granada (24,9%) como en Toscana (24,8%) (Nicoletti y cols, 1980) puede explicarse por una mayor exposición al vector de nuestra población, que en su mayoría procede

de un entorno rural. De hecho, cuando los estudios se circunscriben a personas en estrecho contacto con el medio rural, como trabajadores forestales, la seroprevalencia en humanos, en dichas circunstancias es mucho mayor, cercana al 70% (Valassina y cols, 2003).

V.4. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE VIRUS TOSCANA AISLADOS EN LA PROVINCIA DE GRANADA

Las secuencias de diferentes fragmentos del genoma de las cepas de vTOS aisladas en España a partir de muestras clínicas hasta la fecha son muy parecidas entre sí, pero muestran diferencias en nucleótidos de entre el 15% y el 19%, (Sánchez Seco, 2003) con respecto a las cepas aisladas en Italia según la región analizada (Valassina y cols, 2000), agrupándose las cepas españolas en un único cluster significativamente separado de la cepa italiana de referencia. Esta importante diversidad genética puede tener repercusiones desde el punto de vista diagnóstico ya que con algunos de los cebadores empleados en técnicas descritas de RT-PCR para vTOS (Valassina y cols, 1996) puede no detectarse la variante española (Sánchez Seco y cols, 2003). En nuestro estudio, tras los resultados obtenidos por Sánchez Seco y colaboradores, 2003, se han utilizado cebadores degenerados, que demostraron ser útiles para la amplificación de diferentes especies de *Phlebovirus*, así como para todas las cepas de vTOS españolas e italianas analizadas.

En nuestro trabajo, hemos confirmado que esta elevada homogeneidad de las cepas españolas entre sí ocurre también en las cepas de vTOS aisladas de flebotomos, que filogenéticamente están muy próximas a las aisladas a partir de muestras clínicas. Esto avalaría la posibilidad de una variante propia de vTOS en nuestro medio que ha evolucionado de forma independiente a

otras variedades conocidas del área mediterránea y la posibilidad comentada anteriormente de que la presencia en nuestro entorno de vTOS no es de adquisición reciente. Esta variabilidad genética respecto a las cepas italianas, puede deberse al hecho de que los flebotomos, por su naturaleza, presentan una distribución muy localizada y no vuelan más allá de unos centenares de metros de su lugar de descanso o de alimentación (Gil Collado y cols, 1989). Los flebotomos españoles constituyen así mismo una línea evolutiva diferente a los flebotomos italianos o del norte de África, según demuestran los estudios de isoenzimas. Así, los *Phlebovirus* que infectan a estas colonias de insectos pueden evolucionar independientemente, dando origen a poblaciones genéticamente aisladas, con diferencias significativas en la secuencia del genoma respecto a cepas de otras regiones geográficas. La menor incidencia de casos clínicos de enfermedad por vTOS en Granada respecto a Italia puede deberse a una menor patogenicidad de la cepa del virus que circula en nuestra área.

La importancia del hallazgo en nuestro estudio de circulación de otros *Phlebovirus* aislados a partir de flebotomos está por determinar, no sólo en cuanto a la posibilidad de su participación en patología humana, si no también respecto a la interferencia a modo de reacciones cruzadas que puedan provocar en determinadas técnicas serológicas útiles para el diagnóstico y que hoy día se consideran específicos de vTOS. También sería interesante determinar si la respuesta inmune en humanos frente a estos nuevos *Phlebovirus*, en caso de que la hubiera, protege de alguna manera frente a la infección por vTOS.

VI. CONCLUSIONES

1. La seroprevalencia de infección por virus Toscana en la provincia de Granada es alta (24,9% en general) incrementándose notablemente con la edad hasta una tasa del 60,4 % en mayores de 65 años.
2. No existen diferencias en la prevalencia de infección por virus Toscana en razón del sexo.
3. El riesgo de infección por virus Toscana es mayor en las zonas rurales (seroprevalencia 26,7%) que en el área urbana (seroprevalencia 20,6%), sobre todo en el grupo de mayores de 65 años, en el que las cifras de seroprevalencia de la zona rural y urbana son de 66% y 44,1% respectivamente.
4. Virus Toscana es un importante agente en meningitis linfocitaria en nuestro medio, sobre todo en adultos jóvenes y en meses de verano.
5. La evolución natural de la meningitis por virus Toscana en nuestro medio es la curación sin secuelas.
6. El vector más probable de virus Toscana en nuestro medio es *Phlebotomus perniciosus*.
7. Se confirma en virus Toscana aislado en flebotomos las sospechas existentes tras análisis filogenético de cepas de humanos, sobre la diversidad genética del virus en nuestro medio, distinta a los vTOS italianos

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abonnenc E. Les Phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae). Mem. ORSTOM, 1972 ; 55

Abonnenc E, Leger N. Sur une classification rationnelle des Diptères Phlebotomidae. Cah.Orstom, Ser Ent Med Vet 1976 ; 14 :69-78.

Accardi L, Grò MC, Di Bonito P, Giorgi C. Toscana virus genomic L segment : molecular cloning, coding strategy and amino acid sequence in comparison with other negative strand RNA viruses. Virus Res 1993;27(2):119-131.

Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol 2003;17:1-18.

Artemiev MM. A classification of the subfamily Phlebotominae. Parassitologia 1991; 33(supl 1):69-77.

Baldelli F, Ciufolini MG, Francisci D, Marchi A, Venturi G, Fiorentini C, Luchetta ML, Bruto L, Pauluzzi S. Unusual presentation of life-threatening toscana virus meningoencefalitis. Clin Infect Dis 2004;38:515-520.

Balducci M. Virus transmission to man from Phlebotomus flies: role of the Tuscany virus (Bunyaviridae, Phlebovirus) in the etiology of infections of the central nervous system. Parassitologia 1988;30:179-85.

Bartelloni PJ, Tesh RB. Clinical and serologic responses of volunteers infected with Phlebotomus fever virus (Sicilian type). Am J Trop Med Hyg 1976;25(3):456-462.

Beaty BJ, Calisher CH. Bunyaviridae. Natural history. Curr Top Microbiol Immunol, 1991, 169:27-77

Beaty BJ, Calisher CH, Shope RE. Arbovirus. En: Diagnostic Procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET (eds), 7^a ed. Washington: American Public Health association, 1995; p:189-212

Boiro I, Konstaninov OK, Numerov AD. Isolement du virus de la fièvre de la Vallée du Rift à partir de cheiroptères en République de Guinée. Bull Soc Pathol Exot 1987 ;80(1) :62-67

Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M. Host preference of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in centra Italy. Acta Tropica 2003;88:109-116

Botet J, Portús M. La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912-1985). Rev San Hig Pub 1993;67:255-266.

Braitto A, Corbisiero R, Corradini S, Fiorentino C, Ciufolini MG. Toscana virus infection of the central nervous system in children: A report of 14 cases. J Pediatr 1998;132:144-148.

Braitto A, Corbisiero R, Corradini S, Marchi B, Sancasciani N, Fiorentini C, et al. Evidence of Toscana virus infections without central nervous system involvement: a serological study. Eur J Epidemiol 1997;13:761-4.

Braitto A, Corbisiero R, Corradini S, Fiorenti C, Cuifolini MG. Toscana virus infection of the central nervous system in children: A report of 14 cases. J Pediatr 1998;132(1):144-148

Bruckner DA, Labarca JA. *Leishmania* and *Trypanosoma*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington DC 2003;p:1960-1969

Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. En: En: Knipe MD, Howley RM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds). Fields Virology. 4th ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams and Williams; 2001. p:1043-1125.

Calisher CH, Weinberg A, Muth DJ, Lazuick JS. Toscana virus infection in United States citizen returning from Italy. Lancet 1987;17:165-166.

Casas I, Tenorio A, Echevarría JM, Klapper PE, Cleator GM. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. J Virol Methods 1997;66:39-50

Ciufolini MG, Fiorentini C, di Bonito P, Mochi S, Giorgi C. Detection of Toscana virus-specific immunoglobulins G and M by an enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant viral nucleoprotein. J Clin Microbiol 1999;37: 2010-2012.

Ciufolini MG, Maroli M, Verani P. Growth of two phlebovirus after experimental infection of their suspected sand fly vector, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera : Psychodidae). Am J Trop Med Hyg 1985; 34(1):174-179

Clarke LM, McPhee JMG Cummings RV. Isolation of viruses in conventional tube culture: selection and inoculation of cell cultures. En.: Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: American Society for Microbiology, 1992; p. 8.5.1-13.

Colmenares M, Portús M, Botet J, Dobaño C, Gállego M, Wolf M, Seguí G. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. J Med Entomol 1995;32(2):229-233.

Cusi MG, Valensin PE, Donati M, Valassina. Neutralization of Toscana virus is partially mediated by antibodies to the nucleocapsid protein. J Med Virol 2001;63:72-75.

Di Bonito P, Bosco S, Mochi S, Accardi L, Ciufolini MG. Human antibody response to Toscana virus glycoproteins expressed by recombinant Baculovirus. *J Med Virol* 2002;68:615-619.

Di Bonito P, Mochi S, Gró MC, Fortini D, Giorgi C. Organization of the M genomic segment of Toscana phlebovirus. *J Gen Virol* 1997;78:77-81.

Di Bonito P, Nicoletti L, Mochi S, Accardi L, Marchi A, Giorgi C. Immunological characterization of Toscana virus proteins. *Arch Virol* 1999;144:1947-1960.

Dionisio D, Esperti F, Vivarelli A, Valassina M. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of sandfly fever. *Curr Opin Infect Dis* 2003, 16:383-388.

Dionisio D, Valassina M, Ciufolini MG, Vivarelli A, Esperti F, Cusi MG, et al. Encephalitis without meningitis due to sandfly fever virus serotype Toscana. *Clin Infect Dis* 2001;32:1241-1243.

Dobler G, Treibl J, Haass A, Frosner G, Woesner R, Schimrigk K. Toscana virus infection in German travellers returning from the Mediterranean. *Infection* 1997; 25:325.

Dohm DJ, Rowton ED, Lawyer PG, O'Guinn M, Turell MJ. Laboratory transmission of Rift Valley fever virus by *Phlebotomus duboscqi*, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 2000;37(3):435-438.

Dolmatova AV, Demina NA. Les phlébotomes et les maladies qu'ils transmettent. Enitiations et documentations techniques du ORSTOM 1971; r18:168

Echevarria JM, de Ory F, Guisasola ME, Sánchez-Seco MP, Tenorio A, Lozano A, et al. Acute meningitis due to Toscana virus infection among Spanish patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *J Clin Virol* 2003;26:79-84.

Ehrnst A, Peters CJ, Niklasson B, Svedmyr A, Holmgren B. Neurovirulent Toscana virus (a sandfly fever virus) in Swedish man after a visit to Portugal. *Lancet* 1985;1:1212-1213.

Eitrem R, Niklasson B, Weiland O. Sandfly fever among Swedish tourists. *Scand J Infect Dis* 1991;23:451-457.

Eitrem R, Stylianou M, Niklasson B. High prevalence rates of antibody to three sandfly fever viruses (Sicilian, Naples and Toscana) among Cypriots. *Epidemiol Infect* 1991b;107:685-691.

Eitrem R, Vene S, Niklasson B. Incidence of sand fly fever among Swedish United Nation soldiers on Cyprus during 1985. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43(2):207-211

Endris RG, Tesh RB, Young DG. Transovarial transmission of Rio Grande virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) by the sand fly *Lutzomyia anthophora*. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32:862-864.

Francisci D, Papili R, Camanni G, Morosi S, Ferracchiato N, Valente M, Ciufolini MG, Baldelli F. Evidence of Toscana virus circulation in Umbria: First report. *E J Epidemiol* 2003;18:457-459.

Gallego Berenguer J, Botet Fregona J, Gállego Cullere M, Portás Vinyeta M. Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. En: Hernández Rodríguez S (ed). In memoriam al profesor doctor D. Francisco de Paula Martínez Gómez 1992. Universidad de Córdoba, Córdoba. p: 579-600.

Gil Collado J, Morillas Márquez F, Sanchís Marín MC. Los flebotomos en España. *Rev San Hig Publ* 1989, 68:15-34

Giladi M, Metzkor-Cotter E, Martin DA, Siegman-Igra Y, Korczyn AD, Rosso R, Berger SA, Campbell GL, Lanciotti RS. West Nile encephalitis in Israel, 1999; the New York connection. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:659-661.

Giorgi C, Accardi L, Nicoletti L, Gró MC, Takehara K, Hilditch C, Bishop DH. Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever and Uukuniemi viruses. *Virology* 1991;180:738-753.

Griffin DE. Alphaviruses. En: En: Knipe MD, Howley RM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds). *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams and Williams; 2001.pp:917-962.

Gró MC, Di Bonito P, Fortini D, Mochi S, Giorgi C. Completion of molecular characterization of Toscana phlebovirus genome: nucleotide sequence, coding strategy of M genomic segment and its amino acid sequence comparison to other phleboviruses. *Virus Res* 1997;51:81-91.

Gubler DJ. The global emergence/resurgence of Arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 2002;33:330-342

Hanna JN, Ritchie SA, Phillips DA, Shield J, Bailey MC, Mackenzie JS, Poidinger M, McCall BJ, Mills PJ. An outbreak of Japanese encephalitis in the Torres Strait, Australia, 1995. *Med J Aust* 1996; 165:256-260.

Hemmersbach-Miller M, Parola P, Charrel RN, Durand JP, Brouqui P. Sandfly fever due to Toscana virus: an emerging infection in southern France. *Eur J Intern Med* 2004, 15:316-317.

Hsiung GD. Virus assay, neutralization test and antiviral assay. En : Hsiung GD, Fong CKY, Landry ML, editores. *Hsiung's Diagnostic Virology as Illustrated by Light and electron Microscopy*, 4th edition. New Haven and London: Yale University Press; 1994. p: 46-55

Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever- a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 1999;5:643-650

Karabatsos N. International catalogue of arbovirus, including certain other viruses of vertebrates. *Am Soc Trop Med Hyg* 1985. p.84-86.(San Antonio, TX, USA); 2001 update

Kauffman EB, Jones SA, Dupuis II AP, Ngo KA, Bernard KA, Kramer LD. Virus detection protocols for West Nile virus in vertebrate and mosquito specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3661-3667.

Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD. The establishment, maintenance and productivity of laboratory colony of *Lutzomya longipalpis* (Diptera, Psychodidae) *J Med Ent* 1977; 13:459-472.

Léger N, Depaquit J. Les phlébotomes. En :Dedet, JP (ed). *Les leishmanioses*. Ellipses, 1999. p: 89-108

Leoncini F, Bartolozzi D, Banchi S. Il virus Toscana: un nuovo *Phlebovirus* causa di malattie infiammatorie acute del SNC nell'uomo. *Giorn Mal Inf Parass* 1986;38:649-652

Lewis JD. Phlebotomidae and Psychodidae (sand-flies and moth-flies). En: Smith KGV (ed). *Insects and other arthropods of medical importance*. British Museum (Natural History) London 1973; p:155-179.

Lewis JD, Joung DG, Fairchild GB, Minter DM. Proposals for a stable classification of Phlebotomine sandflies (Dyptera, Psychodidae). *Syst Ent* 1977; 2:319:332

Linthicum KJ, Bailey CL. Observations on the dispersal and survival of a population of *Aedes lineatopennis* (Ludlow) (Diptera: Culicidae) in Kenya. *Bull Entomol Res* 1985; 75:661

Logan TM, Linthicum KJ, Davies FG, Binopal YS, Roberts CR. Isolation of Rift Valley fever virus from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected during an outbreak in domestic animals in Kenya. *J Med Entomol* 1991;28:293-295

Magurano F, Nicoletti L. Humoral response in Toscana virus acute neurologic disease investigated by viral-protein-specific immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(1):55-60

Marfin AA, Gubler DJ. West Nile encephalitis: an emerging disease in the United States. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1713-1719.

Maroli M, Ciufolini MG, Verani P. Vertical transmission of Toscana virus in the sandfly, *Phlebotomus perniciosus*, via the second gonotrophic cycle. *Med Vet Entomol* 1993; 7(3):283-286.

Meegan JM. Rift Valley fever in Egypt: an overview of the epizootics in 1977 and 1978. *Contrib Epidemiol Biostat* 1981; 3:100-113.

Mendoza-Montero J, Gámez-Rueda MI, Navarro-Marí JM, de la Rosa-Fraile M, Oyonarte-Gómez S. Infections due to sandfly fever virus serotype Toscana in Spain. *Clin Infect Dis* 1998;27:434-6.

Morillas Márquez F, Guevara Benítez DC, Úbeda Ontiveros JM, González Castro J. Fluctuations annuelles des populations de Phlébotomés (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenada (Espagne). *Ann Paras Hum Comp* 1983; 58:625-632.

Morillas Márquez F, Sanchís Marín MC, Martín Sánchez J, Acedo Sánchez C. On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the province of Almeria in southeastern Spain. *Parassitologia* 1991;33 (Suppl. 1):437-443.

Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, Huang A, Rosenberg A, Greenberg A, Sherman M, Wong S, Layton M. Outbreak of West Nile virus infection, New York City area. *N Engl J Med* 2001; 334:1807-1814.

Navarro JM, Fernández C, Pérez M, Sanbonmatsu S, de la Rosa M, Sánchez MP. Meningitis por virus Toscana en España: descripción clínica de 17 casos. *Med Clin (Barc)* 2004; 122: 420-2.

Nicol ST. Bunyaviruses. En: Knipe MD, Howley RM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds). *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams and Williams; 2001. pp:1603-1633.

Nicoletti L, Verani P, Ciufolini MG, Lopez MC, Zampetti P. Studies on Phlebotomus-transmitted viruses in Italy: II. Serologic status of human beings. En: J. Vesenjak-Hirjan et al (eds). *Arbovirus in the Mediterranean countries*. *Zbl Bakt Suppl* 9. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart 1980;p:203-208.

Nicoletti L, Verani P, Caciolli S, Ciufolini MG, Renzi A, Bartolozzi D, y cols. Central nervous system involvement during infection by *Phlebovirus Toscana* of residents in natural foci in central Italy (1977-1988). *Am J Trop Med Hyg* 1991;45:429-34.

Oelofsen MJ, Van der Ryst E. Could bats act as reservoir for Rift Valley fever virus?. *Onderstepoort J Vet Res* 1999;66(1):51-54

Oker-Blom N, Salminen A, Brummer-Korvenkontio M. Isolation of some viruses other than tick-borne encephalitis viruses from *Ixodes ricinus* ticks in Finland. *Ann Med Exp Fenn* 1964;42:100-112

Ovenden JR, Mahon RJ. Venereal transmission of Sindbis virus between individuals of *Aedes australis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1984; 21:292-295

Parrot L. Observations biologiques sur *Phlebotomus papatasi* (Scop.) Arch Inst Past Alger 1931 ;9 :442-450.

Parrot L, Donatien A, Lestoquard F. Notes et reflexions sur la biologie de *Phlebotomus perniciosus*. Newstead en Algerie. Arch Inst Past Alger 1933 ;11 :183-191. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995;26(Suppl 3):1-59.

Paul WS, Moore PS, Karabatsos N, Flood SP, Yamada S, Jackson T, Tsai TF. Outbreak of Japanese encephalitis on the island of Saipan, 1990. J Infect Dis 1993; 167:1053-1058.

Pretorius A, Oelofsen MJ, Smith MS, van der Ryst E. Rift Valley fever virus: a seroepidemiologic study of small terrestrial vertebrates in South Africa. Am J Trop Med Hyg 1997;57(6):693-698.

Reinert JF, Harbach RE and Kitching IJ. Phylogeny and classification of *Aedini* (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. Zoological Journal of the Linnean Society 2004;142:289-386

Rico-Hess R, Weaver SC, de Siger J, Medina G, Salas RA. Emergence of a new epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis virus in South America. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:5278-5281.

Rioux JA, Golvan YJ. Epidemiologie des Leishmanioses dans le Sud de la France. Monogr. INSERM, 37, Paris 1969 ; 223

Rivas F, Díaz LA, Cárdenas VM, Daza E, Bruzón L, Alcalá A, De la Hoz O, Cáceres FM, Aristizábal G, Martínez JW, Revelo D, De la Hoz F, Boshell J, Camacho T, Calderón L, Olano VA, Villareal LI, Roselli D, Ludwig G, Tsai T. Epidemia Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colombia, 1995. J Infect Dis 1997; 175:828-832.

Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, LeDuc JW, Esteves K. Yellow fever. A decade of reemergence. *JAMA* 1996; 276:1157-1162.

Rojanasuphot S, Tsai TF, editors. Regional Workshop on Control Strategies for Japanese Encephalitis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1995; 26(suppl 3):1-59.

Rosen L. Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 35:398-402.

Sabin AB. Recent advances in our knowledge of Dengue and sandfly fever. *Am J Trop Med Hyg* 1955;4:198-207

Sabin AB, Philip CB, Paul JR. Phlebotomus (papatacci or sandfly) fever : a disease of military importance ; summary of existing knowledge and preliminary report of original investigations. *JAMA* 1944;125:155-164.

Sanbonmatsu S, Pérez M, Navarro JM, Morillas F, Martín J, de la Rosa M. Seroprevalencia de virus Toscana en la provincia de Granada [abstract]. 125 XI Congreso SEIMC. 2004

Sánchez Seco MP, Echevarría JM, Hernández L, Estévez D, Navarro Marí JM, Tenorio A. Detection and identification of Toscana and other Phleboviruses by RT-PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol* 2003, 71:140-149.

Sánchez-Seco MP, Hernández L, Echevarría JM, Navarro-Marí JM, Estévez D, Tenorio A. Detection and identification of Toscana and other Phleboviruses by means of RT-nested-PCR and sequencing using degenerated primers [abstract]. XII International Congress of Virology; 2002, July 27-August 1, Paris.

Sanchís Marín MC, Villegas G, Morillas Márquez F. Flebotomos y leishmaniosis en la provincia de Almería. *Rev San Hig Pub* 1986; 60:1131-1139.

Schmaljohn CS, Hooper JW. *Bunyaviridae: The viruses and their replication*. En: Knipe MD, Howley RM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman R, Straus SE (eds). *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams and Williams; 2001. pp:1581-1602.

Schwarz T F, Jäger S, Gilch S, Pauli C. Serosurvey and laboratory diagnosis of imported sandfly fever virus, serotype Toscana, infection in Germany. *Epidemiol Infect* 1995;114:501-10.

Schwarz TF, Jäger S, Gilch S, Nitschko H. Nested RT-PCR for detection of sandfly fever virus, serotype Toscana, in clinical specimens, with confirmation by nucleotide sequence analysis. *Res Virol* 1995;146:355-362.

Schwarz TF, Gilch S, Pauli C, Jäger G. Immunoblot detection of antibodies to Toscana virus. *J Med Virol* 1996;49:83-6.

Schwarz TF, Sabine G, Jäger G. Travel-related Toscana virus infection. *Lancet* 1993; 342:803-804.

Soldateschi D, Dal Maso GM, Valassina M, Santini L, Bianchi S, Cusi MG. Laboratory diagnosis of Toscana virus infection by enzyme immunoassay with recombinant viral nucleoprotein. *J Clin Microbiol*, 1999; 37(3):649-652.

Svobodová M, Sádlová J, Chang KP, Volf P. Short report: distribution and feeding preference of the sandflies *Phlebotomus sergenti* and *P.papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68(1):6-9.

Tesh RB. The genus *Phlebovirus* and its vectors. *Ann Rev Entomol* 1988;33:169-181

Tesh RB, Chaniotis BN. Transovarial transmission of viruses by phlebotomine sandflies. *Ann N York Acad Sci* 1975;(8)viro, 266:125-134

Tesh RB, Boshell J, Young DG, Morales A, Corredor A, Modi GB, Ferro de Carrasquilla C, de Rodríguez C, Gaitan MO. Biology of Arboledas virus, a new phlebotomus fever serogroup virus (Bunyaviridae:Phlebovirus) isolated from sand flies in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35(6):1310-1316.

Tesh RB, Lubroth J, Guzman H. Simulation of Arbovirus overwintering: survival of Toscana virus (Bunyaviridae: *Phlebovirus*) in its natural sand fly vector *Phlebotomus perniciosus*. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47(5):574-581

Tesh RB, Modi GB. Maintenance of Toscana virus in *Phlebotomus perniciosus* by vertical transmission. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36(1):189-193

Tesh RB, Peters CJ, Meegan JM. Studies on the antigenetic relationship among phleboviruses. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31:149-155

Tesh RB, Saidi S, Gajdamovic SJ, Rodhain F, Vesenjask-Hirjan J. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bull World Health Organ* 1976;54:663-673

Theodor O. Observations on the Hibernation of *Phlebotomus papatasi* (dipt.) *Bull Ent Res* 1934; 25:459-472.

Theodor O. On the relation of *Phlebotomus papatasi* to the temperature and humidity of the environment. *Bull Ent Res* 1936; 27:651-653

Theodor O. Classification of the Old World species of the subfamily *Phlebotominae* (Diptera, Psychodidae). *Bull Ent Res* 1948; 39:85-115

Thompson WH, Beaty BJ. Venereal transmission of LaCrosse virus from male to female *Aedes triseriatus*. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27:187-196.

Travassos da Rosa APA, Tesh RB, Pinheiro FP, Travassos da Rosa JFS, Peterson NE. Characterization of eighth new phlebotomus fever serogroup

arboviruses (Bunyaviridae: Phlebovirus) from the Amazon region of Brazil. *Am J Med Hyg* 1983;32(5):1164-1171.

Trouillet J. *Ecologie des Phlébotomes du Congo (Diptera, Psychodidae)*. Thèse Scienc Nat Univ Paris-Sud 1981 :392

Tsai TF, Chandler LJ. Arboviruses. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington DC 2003; p:1553-1569.

Turell MJ, Perkins PV. Transmission of Rift Valley fever virus by the sandfly *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1990;42:185-188

Valassina M, Cuppone AM, Bianchi S, Santini L, Cusi MG. Evidence of Toscana virus variants circulating in Tuscany, Italy, during the summers of 1995 to 1997. *J Clin Microbiol* 1998;36:2103-4.

Valassina M, Cusi MG, Valensin PE. Rapid identification of Toscana virus by nested PCR during an outbreak in the Siena area of Italy. *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2500-2502

Valassina M, Cusi MG, Valensin PE. A Mediterranean arbovirus: The Toscana virus. *J Neurovirol* 2003;9:577-583

Valassina M, Meacci F, Valensin PE, Cusi MG. Detection of neurotropic viruses circulating in Tuscany: the incisive role of Toscana virus. *J Med Virol* 2000;60:86-90.

Valassina M, Valentini M, Pugliese A, Egisto P, Cusi MG. Serological survey of Toscana virus infection in a high-risk population in Italy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(3):483-484

Valassina M, Valentini M, Valensin PE, Cusi MG. Fast duplex one-step RT-PCR for rapid differential diagnosis of entero- or toscana virus meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:201-5.

Van der Stuyft P, Gianella A, Pirard M, Cespedes J, Lora J, Peredo C, Pelegrino JL, Vorndam V, Boelaert M. Urbanization of yellow fever in Santa Cruz, Bolivia. *Lancet* 1999;353:1558-1562.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens E, Estes M, Lemon S, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch D, Pringle CR, Wickner RB (eds). *Virus Taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of viruses.* Academic Press 2000, New York San Diego.

Verani P, Ciufolini MG, Caciolli S, Renzi A, Nicoletti L, Sabatinelli G, Bartolozzi D, Volpi G, Amaducci L, Coluzzi M, Paci P, Balducci M. Ecology of viruses isolated from sand flies in Italy and characterization of a new *Phlebovirus* (Arbia virus). *Am J Trop Med Hyg* 1988;38(2):433-439.

Verani P, Lopes MC, Nicoletti L, Balducci M. Studies on Phlebotomus-transmitted viruses in Italy: I. Isolation and characterization of a Sandfly fever Naples-like virus.. En: Vesenjak-Hirjan J, Porterfield JS, and Arslanagic E, eds., *Arboviruses in the Mediterranean Countries. Zbl.Bakt.Suppl.*9. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart. 1980; pp. 195-201

Verani P, Nicoletti L, Ciufolini MG. Antigenic and biological characterization of Toscana virus, a new phlebotomus fever group virus isolated in Italy. *Acta Virol* 1984;28:39-47.

Watts DM, MacDonald C, Bailey CL, Meegan JM, Peters CJ, McKee KT Jr. Experimental infection of *Phlebotomus papatasi* with sand fly fever Sicilian virus. *Am J Trop Med Hyg* 1988;39(6):611-616.

Welch DF, Slater LN. *Bartonella* and *Afipia*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington DC 2003;p:824-834.

World Health Organization. Yellow fever, 1998-1999. Wkly Epidemiol Rec 2000;75:322-328.

World Health Organization. An outbreak of Rift Valley fever, Eastern Africa, 1997-1998. Wkly Epidemiol Rec 1998;73:105-109.

World Health Organization. Rift Valley fever, Saudi Arabia, August-October 2000. Wkly Epidemiol Rec 2000;75:370-371.