

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA
H.U. VIRGEN DE LAS NIEVES



TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIÓN DE VIRUS TOSCANA COMO
PATÓGENO HUMANO EN PROCESOS “NO
NEUROLÓGICOS” Y DETECCIÓN DE POSIBLES
RESERVORIOS EN LA PROVINCIA DE GRANADA**

M^aPurificación Begoña Palop Borrás

Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: M^a Purificación Begoña Palop Borrás
D.L.: GR. 1935-2009
ISBN: 978-84-692-1834-1

El **Dr. José María Navarro Marí**, Jefe de Servicio del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y la **Dra. María Jiménez Valera**, Profesora titular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral que presenta la Licenciada **M^a Purificación Begoña Palop Borrás** con el título :” **IMPLICACIÓN DE VIRUS TOSCANA COMO PATÓGENO HUMANO EN PROCESOS “NO NEUROLÓGICOS” Y DETECCIÓN DE POSIBLES RESERVORIOS EN LA PROVINCIA DE GRANADA**” 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, febrero de 2009

Fdo: José María Navarro Marí

Fdo: María Jiménez Valera

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| I.1. ARBOVIRUS..... | 4 |
| I.2. FAMILIA <i>BUNYAVIRIDAE</i>..... | 10 |
| I.2.1. ESTRUCTURA VÍRICA..... | 11 |
| I.2.1.1. MORFOLOGÍA..... | 11 |
| I.2.1.2. ORGANIZACIÓN GENÉTICA..... | 12 |
| I.2.1.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS..... | 13 |
| I.2.2. TAXONOMÍA..... | 13 |
| I.2.3. CICLO VITAL..... | 14 |
| I.3. PHLEBOVIRUS..... | 15 |
| I.3.1. VIRUS DEL GRUPO "FIBRE DE LOS FLEBOTOMOS"..... | 16 |
| I.4. VIRUS TOSCANA..... | 18 |
| I.4.1. HISTORIA..... | 18 |
| I.4.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y ANTIGÉNICAS..... | 19 |
| I.4.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS..... | 21 |
| I.4.4. EPIDEMIOLOGÍA Y ECOLOGÍA..... | 24 |
| I.4.4.1. VECTORES Y RESERVORIOS..... | 24 |
| I.4.4.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA..... | 26 |
| A) ESPAÑA..... | 26 |
| B) OTROS PAÍSES EUROPEOS..... | 28 |
| B.1 ITALIA..... | 28 |
| B.2 FRANCIA..... | 29 |
| B.3 CHIPRE..... | 29 |
| B.4 GRECIA..... | 29 |
| B.5 PORTUGAL..... | 30 |
| B.6 ALEMANIA..... | 30 |
| I.4.4.3. DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL..... | 30 |
| I.4.4.4. RIESGO OCUPACIONAL..... | 31 |
| I.4.4.5. VARIABILIDAD GENÉTICA..... | 31 |
| I.4.5. DIAGNÓSTICO..... | 33 |
| I.4.5.1. AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR..... | 33 |
| I.4.5.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR..... | 34 |
| I.4.5.3. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO..... | 36 |
| II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| III. MATERIAL Y MÉTODOS | 43 |
| III.1. ESTUDIO DE PATOLOGÍA NO NEUROLÓGICA VTOS | 45 |
| III.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y PERIODO DE ESTUDIO | 45 |
| III.1.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG/IgM VTOS | 45 |
| III.2. ESTUDIO DE PRESENCIA DE VTOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS | 47 |
| III.2.1. MUESTRAS | 47 |
| III.2.1.1. ANIMALES Y PERIODO DE ESTUDIO | 47 |
| III.2.2. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO | 48 |
| III.2.2.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS | 48 |
| III.2.2.2. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS | 49 |
| III.2.2.2.A. AISLAMIENTO DE VIRUS EN CULTIVO CELULAR | 49 |
| III.2.2.2.B. MÉTODOS MOLECULARES | 50 |
| *EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 50 |
| I) MUESTRAS DE SUERO | 50 |
| I) SOBRENADANTES DE CULTIVO CELULAR | 51 |
| *AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 52 |
| III.2.2.2.C. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA. ESTUDIO DE | |
| SEROPREVALENCIA | 53 |
| III.3. REGISTRO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 55 |
| III.3.1. ESTUDIO DE PATOLOGÍA NO NEUROLÓGICA EN HUMANOS | 55 |
| III.3.2. ESTUDIO DE VTOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS | 57 |
| III.3. REGISTRO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 55 |
| ANEXO 1 | 58 |
| ANEXO 2 | 61 |
| IV. RESULTADOS | 63 |
| IV.1. ESTUDIO DE PATOLOGÍA NO NEUROLÓGICA VTOS | 65 |
| III.1.1. DATOS DESCRIPTIVOS | 65 |
| IV.1.2. RESULTADOS DE IgG ANTI-VTOS | 66 |
| IV.1.3. RESULTADOS DE IgM ANTI-VTOS | 68 |
| IV.2. ESTUDIO DE VTOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS | 69 |
| III.2.1. DATOS DESCRIPTIVOS | 69 |
| IV.2.2. RESULTADOS DEL CULTIVO DE VTOS | 73 |
| IV.2.3. RESULTADOS RT-PCR EN TIEMPO REAL FRENTE A VTOS | 74 |
| IV.2.3. RESULTADOS DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA | 75 |

| | |
|--|-----------|
| V. DISCUSIÓN | 79 |
| V. PATOLOGÍA NO NEUROLÓGICA VTOS..... | 81 |
| V. ESTUDIO DE VTOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS | 87 |
| VI. CONCLUSIONES | 93 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 97 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | ADN complementario |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| Cp | “Crossing point” |
| CS | Centro de Salud |
| DO | Densidad Óptica |
| FHCC | Virus de la Fiebre Hemorrágica de Crimea Congo |
| FITC | Isotiocianato Fluoresceína |
| IC | Intervalo de Confianza |
| ICTV | “International Committee on Taxonomy of Viruses” |
| IF | Inmunofluorescencia |
| IFI | Inmunofluorescencia indirecta |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IH | Inhibición de la Hemaglutinación |
| ECP | Efecto citopático |
| EIA | Enzimoimmunoanálisis |
| ELISA | “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” |
| EVITAR | Red de Enfermedades Víricas Transmitidas por Artrópodos y Roedores |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| MEM | Medio Esencial Mínimo |
| min | Minuto(s) |
| Nr | Nucleoproteína recombinante de VTOS |
| NS | Proteínas No Estructurales (“Non-Structural proteins”) |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”) |
| RFC | Reacción de Fijación de Complemento |
| RIPA | Reacción de Inmunoprecipitación recombinante (“Recombinant Immunoprecipitation Assay”) |
| RT-PCR | Reversotranscripción + PCR |

| | |
|-------------|--|
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| TAAN | Técnicas Amplificación Ácidos Nucleicos |
| VFVR | Virus de la fiebre del Valle del Rift |
| VN | Virus Nápoles |
| VS | Virus Sicilia |
| VTOS | Virus Toscana |
| VWN | Virus West Nile |

I. INTRODUCCIÓN

El virus Toscana (VTOS) es un arbovirus transmitido por flebotomos que se incluye dentro del género *Phlebovirus*, de la familia *Bunyaviridae*. Los arbovirus (ARtropod BORne Viruses) son un grupo heterogéneo de virus, pertenecientes a distintas familias y géneros, con la característica común de ser transmitidos por artrópodos. VTOS se transmite al hombre por la picadura de un flebotomo (*Phlebotomus perniciosus* constituye su principal vector, aunque otras especies como *Phlebotomus perfiliewi* también pueden difundirlo).

Su denominación hace referencia a la región italiana donde se produjo su aislamiento inicial y se identificaron los primeros casos humanos (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., 1995a ; Santos, 2007), Italia (Calisher y cols., 1987; Nicoletti y cols., 1991; Schwarz y cols., 1995a; Braitto y cols., 1998a; Valassina y cols., 1998), Chipre (Eitrem y cols., 1990), Francia (Hermersbach-Miller y cols., 2004), y, desde 1988, también en España (Eitrem y cols., 1991a; Mendoza-Montero y cols., 1998; Echevarría y cols., 2003; Navarro y cols., 2004; Martínez-García y cols., 2007), lugares donde se encuentran dichos vectores. También se han descrito infecciones importadas de viajeros procedentes de estos países: Suecia (Ehrnst y cols., 1985; Eitrem y cols., 1991a; Schwarz y cols., 1995a), Alemania (Schwarz y cols., 1996 y 1995^a; Dobler y cols., 1997) y Estados Unidos (Calisher, 1987).

VTOS se ha detectado asociado fundamentalmente a cuadros de meningitis o meningoencefalitis, principalmente en verano, siendo en nuestro medio, después de *Enterovirus*, el virus más frecuentemente implicado en meningitis linfocitarias agudas.

Se desconoce si, al igual que otros arbovirus, existen reservorios animales de este virus.

I.1.ARBOVIRUS

Los arbovirus son un grupo de virus taxonómicamente heterogéneo, que comprende 534 virus que tienen en común la participación de vectores en su transmisión.

El catálogo internacional de arbovirus (Karabatsos, 1985) incluye también ciertos virus zoonóticos, relacionados taxonómicamente, como hantavirus, que se transmiten directamente de los animales al hombre sin la participación del vector.

La mayoría de arbovirus se transmite entre artrópodos específicos y huéspedes vertebrados (pájaros y pequeños mamíferos), en los que la infección suele ser asintomática. Por el contrario, aquellas infecciones que ocurren en animales para los que el virus no se ha adaptado, la relación parasitaria suele desembocar en enfermedad de intensidad variable o muerte.

Existen unos 150 arbovirus que pueden causar enfermedad al hombre, la mayoría de ellos pertenecen a las familias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Bunyaviridae*. 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: Río Grande (Endris y cols., 1983), virus de la Fiebre del Valle del Rift (VFVR) (Linthicum y cols., 1985), LaCrosse (Thompson y Beaty, 1978), Dengue (Rosen, 1987), Sindbi (Ovenden y Mahon, 1984), virus de la fiebre de

los flebotomos (Ciufolini y cols., 1985; Tesh y Chaniotis, 1975; Tesh y cols., 1992).

Los ciclos de los arbovirus pueden clasificarse en ciclos de mantenimiento y ciclos de amplificación (**Figura I.1**). Los ciclos de mantenimiento son los que permiten la permanencia del virus en la naturaleza. En general, se producen en ambientes selváticos o rurales y suelen ser los responsables de niveles bajos de endemidad en ciertas regiones. En determinadas circunstancias puede producirse la introducción de un huésped accidental dentro de ese ciclo silvestre, permitiendo que el virus ingrese, por ejemplo, a un ambiente urbano, lo que genera ciclos de transmisión con diferentes vectores y reservorios. También pueden producirse alteraciones ecológicas o modificaciones humanas en el ambiente que posibilitan un aumento de las poblaciones de vectores, un aumento de los vertebrados infectados y/o un aumento del nivel de circulación del virus, generando los denominados ciclos de amplificación que, en general, desencadenan brotes epidémicos (Morales y cols., 2008).

Usualmente los arbovirus ejercen efecto escaso o nulo sobre el artrópodo vector, mientras que la infección de los huéspedes vertebrados puede resultar en una morbi-mortalidad significativa, sobre todo cuando enferman a huéspedes accidentales, que no se comportan como los reservorios virales habituales. La infección ocurre probablemente en el músculo u otras células cerca del sitio de la picadura y pasa a nódulos linfáticos regionales, produciendo una viremia primaria, que resulta en infección de los tejidos asociados con el sistema vascular, y de aquí una viremia secundaria de mayor duración y de altos títulos. Este proceso lleva a la infección secundaria de los órganos diana, tales como el hígado en la fiebre amarilla o el SNC en las encefalitis (Brès, 1986).

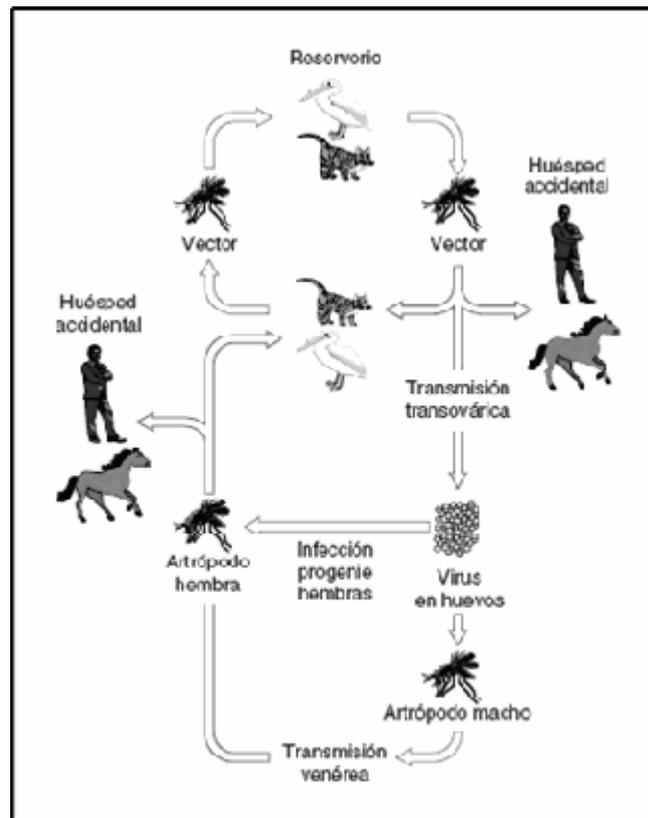


Figura 1.1. Ciclo biológico general de los arbovirus. Tomado de Sánchez y Navarro, 2005

Lo más frecuente es que la infección en humanos por arbovirus 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 algunas arbovirosis tienen distribución universal, otras tienen una distribución geográfica más restringida, ya que se han adaptado a un

binomio vector transmisor/huésped vertebrado específico. La distribución geográfica de las arbovirosis viene determinada en gran medida por el rango de distribución 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 en el hombre 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 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 las 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 de la Fiebre hemorrágica Congo.Crimea (FHCC) y *Phlebovirus* (VFVR) (Nichol, 2001)

- Asociados a cuadros neurológicos: *Flavivirus* (Encefalitis de San Luis, Encefalitis Japonesa, West Nile (VWN), Encefalitis transmitidas por garrapatas) (Burke y Monath, 2001); *Alphavirus* (Encefalitis Equina del Este y del Oeste) (Griffin, 2001); *Bunyavirus* (Encefalitis de La Crosse) y *Phlebovirus* como VTOS y VFVR (Nichol, 2001)

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

En la **Tabla I.1** se muestra un resumen de los arbovirus más importantes para el hombre junto con sus vectores, reservorios, manifestaciones clínicas y distribución geográfica.

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

| Virus | Vector | Huésped | Clínica ^a | Continente |
|---|------------|------------------------------|----------------------|---------------------|
| <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 hasta ahora 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 por Dengue, fiebre amarilla (Robertson y cols., 1996; WHO, 2000a; Van der Stuyft y cols., 1999), fiebre del Valle del Rift (Meegan, 1981; WHO, 1998; WHO, 2000b), encefalitis japonesa (Rojanasuphot y Tsai, 1995; Paul y cols., 1993; Hanna y cols., 1996), VWN (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., 1997).

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, como virus Nápoles (VN), virus Sicilia (VS) y VTOS 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 VFVR.

En España las arbovirosis que requieren mayor atención en la actualidad son, por un lado, la infección por VTOS, que hasta la fecha es el arbovirus patógeno más frecuentemente aislado en nuestro país y la infección por VWN, del que se han descrito casos recientes en países limítrofes como Francia (Mailles y cols., 2003), Portugal (Connell y cols., 2004) y en el Norte de Africa. Estudios de seroprevalencia de infecciones por VWN concluyen la circulación

en el pasado de este virus, así como la exposición humana del mismo (Bernabeu-Wittel y cols., 2007). En el año 2007 se ha notificado en España el primer caso de infección neurológica en un paciente con meningitis aséptica (Kaptoul y cols., 2007). Aunque esta arbovirosis es por ahora infrecuente en nuestro medio, se ha constatado la circulación local de VWN en aves salvajes de algunos humedales de nuestro entorno (Figuerola y cols., 2007).

I.2.FAMILIA *BUNYAVIRIDAE*

La familia *Bunyaviridae* se constituyó en 1975 hasta abarcar un grupo grande de virus transmitidos por artrópodos que comparten propiedades morfológicas, morfogénicas y antigénicas (Schmaljohn y cols., 2001).

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*, *Phlebovirus* y *Tospovirus* (Van Regenmortel y cols., 2000).

Algunos de estos virus son causa de importantes enfermedades humanas como: virus California (*Bunyavirus*), VFVR (*Phlebovirus*), virus Hantaan (*Hantavirus*), virus FHCC (*Nairovirus*) (Nichol, 2001).

Los virus de esta familia 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 *Tospovirus*, que son virus de plantas y *Hantavirus* cuyos huéspedes son roedores y no tienen ningún artrópodo vector (Nichol, 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. Son esféricos o pleomórficos, según el método de fijación utilizado.

La envuelta está compuesta por una bicapa lipídica de 5 a 7 nm de espesor que contiene espículas de entre 5 y 10 nm de longitud, que consisten en heterodímeros de dos glicoproteínas virales G1 y G2.

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

El interior del virión está compuesto de tres nucleocápsides formadas a su vez por tres segmentos de genoma viral (ARN) (L,M,S) y proteínas. Los tres segmentos de ARN forman complejo con las proteínas de la nucleocápside para formar las estructuras nucleocapsídicas. Las nucleocápsides junto con la ARN polimerasa se empaquetan dentro de la envuelta lipídica para formar el virión completo (**Figura I.2**).

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).

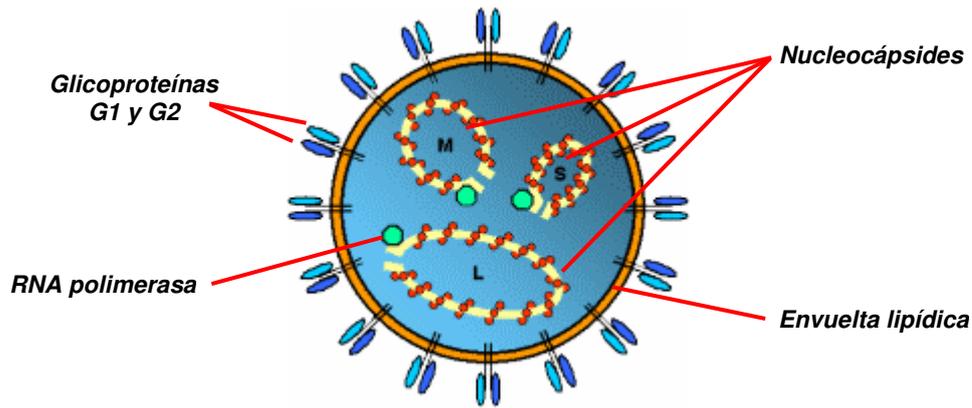


Figura I.2.-. Morfología del virión de *Bunyaviridae*

I.2.1.2. ORGANIZACIÓN GENÉTICA

El genoma de *Bunyaviridae* está estructurado en tres segmentos de ARN monocatenario y de polaridad negativa denominados L (“large”, grande), M (“medium”, mediano) y S (“small”, pequeño).

Todos los miembros de la familia codifican todas sus proteínas estructurales en el ARN de polaridad negativa: proteína L, que es una ARN polimerasa, codificada en el segmento L de ARN; glicoproteínas G1 y G2, codificadas en el segmento M; y proteína N de la nucleocápside codificada en el segmento S. Las proteínas no estructurales (NS) de *Bunyavirus*, *Hantavirus* y *Nairovirus* están codificadas también en el ARN de polaridad negativa, mientras que *Phlebovirus* y *Tospovirus* utilizan una estrategia ambisentido. *Phlebovirus* codifica una proteína NS en el extremo 5' del ARN viral del segmento S (NSs), y *Tospovirus* codifican las proteínas NS en el extremo 5' del ARN viral de los segmentos M y S (NSm y NSs, respectivamente).

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 (Schmaljohn y Hooper, 2001).

I.2.1.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El coeficiente de sedimentación del virión es de 400-500s. El virión está compuesto por un 2% de ARN, 58% de proteínas, 20-30% de lípidos y 2-7% de carbohidratos (Schmaljohn y Hooper, 2001).

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

I.2.2. TAXONOMÍA

Las características moleculares y antigénicas se han usado para definir los distintos géneros dentro de esta gran familia, así como para separar y agrupar virus dentro de cada género.

Por otro lado, la taxonomía de *Bunyaviridae* se ha basado en métodos serológicos como la neutralización, inhibición de la hemaglutinación (IH), reacción de fijación de complemento (RFC), o enzimoimmunoanálisis (EIA), 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 RFC, sin embargo, está más dirigida hacia los antígenos de las proteínas de la nucleocápsida, codificadas por el segmento S del ARN. En general, los determinantes antigénicos de la nucleocápside están más conservados que los de las glicoproteínas y por tanto la RFC 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 reversotranscripción 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 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. En **Tabla I.2** se muestran algunos de los virus más representativos de cada género o con mayor importancia para el hombre.

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

| Género | Serogrupo | 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> | Fiebre Hemorrágica Crimen Congo | 3 | FHCC |
| <i>Phlebovirus</i> | Fiebre de los flebotomos | 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.2.3. CICLO VITAL

La mayoría de los virus de la familia *Bunyaviridae* se transmiten entre huéspedes vertebrados susceptibles a través de artrópodos hematófagos que actúan como vectores. Los géneros *Hantavirus* y *Tospovirus* son excepción en

esta familia, ya que los primeros se mantienen y transmiten por roedores y los últimos se transmiten a huéspedes vegetales por pulgones. Cada género se asocia típicamente con un taxón concreto como vector. Así, *Bunyavirus* se transmite por mosquitos, *Nairovirus* por garrapatas y *Phlebovirus* por flebotomos. El rango de huéspedes vertebrados que infectan es muy variado, principalmente mamíferos y pájaros

La especificidad del ciclo de amplificación y transmisión para cada virus determinado es importante, de manera que normalmente sólo una o pocas especies de vectores y huéspedes vertebrados se ven implicadas en estos ciclos. Esta especificidad está determinada en parte por los atributos biológicos y el comportamiento del vector, como preferencia de alimentación sobre ciertos huéspedes, actividad estacional, etc; y también por los hábitos y atributos del vertebrado, su distribución geográfica, etc. (Beaty y Calisher, 1991).

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 “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, en el viejo mundo, son los virus VFVR, VN, 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 los 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-Blom y

cols., 1964) y VFVR 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. VIRUS DEL GRUPO “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 VFVR, VN, VS (filogenéticamente, en un grupo aparte) y VTOS. 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). El hallazgo de numerosos machos infectados por *Phlebovirus* (Verani y cols., 1988) apoya la transmisión transovárica de los mismos; de hecho, se han podido establecer líneas de *Phlebotomus perniciosus* capaces de transmitir por vía transovárica persistentemente VTOS (Tesh y Modi, 1987; Maroli y cols., 1993). En otro experimento, se demostró la transmisión venérea de VTOS de machos infectados transovaricamente a hembras no infectadas. Esta es la primera demostración de transmisión sexual de un phlebovirus por el flebotomo. Si se produce la transmisión venérea en la naturaleza, proporcionaría un método alternativo de amplificación del virus en la población de vectores, en ausencia de ciclo en los vertebrados (Tesh y cols., 1992). No obstante, otra posibilidad sigue siendo la existencia de hospedadores reservorios, ya que la tasa de infección disminuye en cada generación (Tesh y Modi, 1987).

Tradicionalmente VFVR 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, 2000b). Periódicamente ocurren brotes epizooticos después de lluvias intensas en zonas ganaderas (Meegan, 1981). Los rebaños ovinos, 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 VFVR de murciélagos (Boiro y cols., 1987; Oelofsen y Van der Ryst, 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 VFVR se asocia a abortos y alta tasa de mortalidad, causando importantes pérdidas económicas. En humanos, VFVR 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).

VN y VS 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 donde 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 Papataci”. La relación con los flebotomos fue sugerida por Taussing en 1905. Durante la 2ª Guerra Mundial se produjeron epidemias entre las tropas aliadas, y en los años 1943 y 1944 se aislaron VN y VS a partir del suero de fase aguda de soldados enfermos, que se inocularon en voluntarios sanos. Más tarde, estas cepas fueron adaptadas al cultivo en ratones recién nacidos mediante sucesivos pases intracerebrales (Sabin, 1955).

Posteriores aislamientos y estudios de seroprevalencia demuestran que VN y VS 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., 1976). La distribución de estos virus se solapa con la de *Phlebotomus 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

VTOS fue aislado por primera vez en 1971 durante un estudio de campo sobre la ecología de arbovirus en *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 se aisló por primera vez, se incluyó en el serogrupo de los virus del grupo “fiebre de los flebotomos”, género *Phlebovirus*, familia *Bunyaviridae*, y se registró en el Catálogo Internacional de Arbovirus (Karabatsos, 1985). Más tarde también se aisló de *P.perfiliewi* como resultado de un estudio para determinar posibles vectores de VTOS en distintas áreas de la Toscana (Verani y cols., 1988). Posteriormente se detectó VTOS en *Sergentomyia minuta* en un estudio realizado en Marsella (Charrell y cols., 2006).

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 por primera vez del líquido cefalorraquídeo (LCR) de una mujer joven con diagnóstico de meningitis linfocitaria (Braitto y cols., 1997). A diferencia de otros virus transmitidos por flebotomos en Italia, como VN o VS, 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 VTOS 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 VTOS obtenidas del mismo “pool” de flebotomos y aisladas y mantenidas en dos sistemas de cultivo diferentes, en cerebro de ratón y en células Vero. Tras 4-6 pases en los distintos sistemas de cultivo, algunas de estas propiedades biológicas cambian, tales como el tamaño de placas formadas, e incluso la virulencia de la cepa sobre ratones blancos (Verani y cols., 1984).

Posteriormente se ha descrito la presencia de VTOS, además de en Italia, en otros países mediterráneos como España (Mendoza-Montero y cols., 1998), Portugal (Ehrnst y cols., 1985), Chipre (Eitrem y cols., 1991b), Argelia (Dionisio y cols., 2003) y Francia (Hemmersbach-Miller y cols., 2004; Peyrefitte y cols., 2005).

I.4.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y ANTIGÉNICAS

Como el resto de los miembros de la familia *Bunyaviridae*, 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. Posee un genoma ARN de cadena sencilla y polaridad negativa dividido en tres segmentos, S, M y L. Estos tres segmentos se empaquetan en tres nucleocápsides junto con la proteína N y una ARN polimerasa.

El segmento S consta de 1869 nucleótidos y tiene una estrategia de codificación ambisentido. La proteína N (253 aminoácidos, 27 KDa) o nucleoproteína, que forma las nucleocápsidas, se traduce a través de un

ARNm subgenómico complementario al ARN viral a partir del extremo 3', mientras que un ARNm subgenómico correspondiente al extremo 5' codifica una proteína NS (NSs; 316 aminoácidos y 37 KDa) de función desconocida. (Giorgi y cols., 1991).

El segmento M, con 4215 nucleótidos, codifica 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).

El segmento L, de 6404 nucleótidos, codifica la proteína L (2095 aminoácidos), precursora de la ARN polimerasa que forma también parte de las nucleocápsides (Di Bonito y cols., 1999). La región central de la proteína L de VTOS y VFVR está muy conservada, observándose una homología en la secuencia de aminoácidos del 68% (Accardi y cols., 1993) (**Figura I.3**)

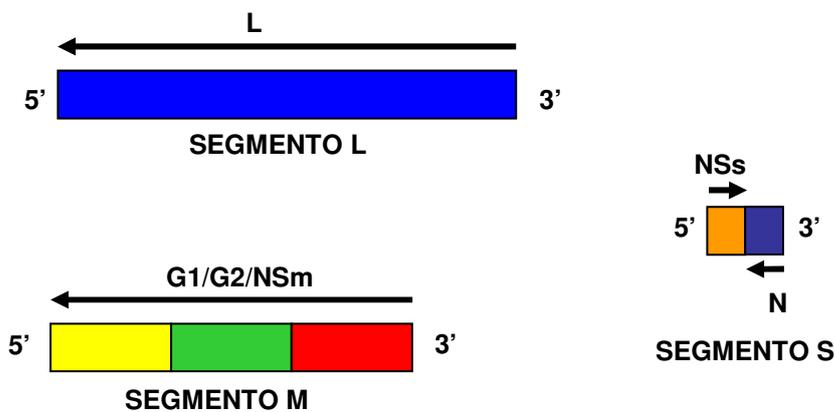


Figura I.3.-Organización genética de virus Toscana

La nucleoproteína N de VTOS es altamente inmunogénica, 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 y cols., 2001). Las glicoproteínas G1 y G2 son responsables del reconocimiento del receptor celular y confieren al virus la capacidad de hemaglutinación. La respuesta

inmune frente a las glicoproteínas G1 y G2 es más heterogénea, ya que no se detecta en todos los pacientes infectados por VTOS (Magurano y Nicoletti, 1999; Di Bonito y cols., 2002). En un estudio realizado para desarrollar una vacuna contra VTOS en un modelo animal de ratones donde se investigó la capacidad de las proteínas estructurales de VTOS, la proteína N de nucleocapside y las 2 glicoproteínas Gn (G1) y Gc (G2), obtenidas como proteínas recombinantes, se observó que sólo la combinación N-Gc era capaz de proteger el 100% de los animales con una cepa neurovirulenta de VTOS (Savellini y cols., 2008)

Los estudios antigénicos sobre *Phlebovirus* basados en RFC (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 VN que con VS; y sin embargo, con técnicas de inmunoblot, la reacción cruzada de VTOS con VS es más fuerte que con VN (Schwarz y cols., 1996). No se han observado reacciones cruzadas, o de muy baja intensidad entre los distintos serotipos de virus transmitidos por flebotomos con técnicas de neutralización (Tesh y cols., 1982; Eitrem y cols., 1991b).

I.4.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los estudios de seroprevalencia sugieren que una proporción de infecciones por VTOS son asintomáticas o paucisintomáticas. Son necesarios estudios adicionales para evaluar la relación de infecciones sintomáticas *versus* asintomáticas o paucisintomáticas. Las altas tasas de seroprevalencia entre la población de las distintas regiones donde se ha aislado VTOS, 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., 2003b).

En algunos casos, la infección por VTOS causa una enfermedad febril autolimitada sin manifestaciones de SNC; estos pacientes no necesitan

hospitalización y no suelen estudiarse con más profundidad. Esto explicaría que las tasas de infección por VTOS estén subestimadas (Charrell y cols., 2005).

En un estudio realizado en la provincia de Modena (región Emilia Romagna, Italia) sobre 9 casos registrados de infección por VTOS en el trienio 1999-2001 hubo 6 casos de meningitis, 2 de meningoencefalitis y 1 de eritema febril sin manifestaciones meníngeas (Portolani y cols., 2002). Hace poco se describió un caso de enfermedad influenza-like por VTOS (Hemmersbach-Miller y cols., 2004). Recientemente y como consecuencia del presente estudio se ha relacionado VTOS con un eritema febril (Sanbonmatsu y cols., 2009).

Como se ha comentado anteriormente, VTOS y VFVR son los únicos *Phlebovirus* con capacidad neurovirulenta.

La infección por VTOS en humanos se produce después de un periodo de incubación de unos pocos días a 2 semanas, con un comienzo abrupto (70%) con dolor de cabeza (100%, 18h-5 días), fiebre (76%-97%), náuseas y vómitos (67%-88%) y mialgias (18%). El examen físico puede mostrar rigidez de nuca (53%-95%), signos de Kernig (87%), niveles deteriorados de consciencia (12%) temblores (2,6%), paresias (1,7%) y nistagmus (5,2%) (Charrell y cols., 2005). Se suele manifestar como un meningitis linfocitaria, generalmente de carácter benigno que se resuelve de manera espontánea, a corto o medio plazo, con una media de duración de 7 días, 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 y con secuelas de hidrocefalia y epidídimo-orquitis (Baldelli y cols., 2004). En nuestra casuística encontramos 2 casos de meningitis con secuelas (Sanbonmatsu y cols., 2009).

En cuanto a los datos analíticos complementarios, en una serie de 17 pacientes con meningitis por VTOS detectados en España entre 1988 y 2003, el 100% presentaron pleocitosis en LCR con predominio linfocitario, valores de

glucosa normales y proteínas elevadas en el 70% de los casos; el 29,4% presentó leucocitosis en sangre periférica y sólo el 5,9% leucopenia (Navarro y cols., 2004) .Recientemente, se ha descrito una meningitis con pleocitosis con predominio de polimorfonucleares con secuela de sordera neurosensorial bilateral. (Martinez-García y cols., 2008).

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).

En una revisión de infecciones del SNC (meningitis aséptica o encefalitis) desde 2001 a 2004 en el Sur de Italia (provincia de Nápoles) se detectó VTOS en 7 de 126 pacientes incluidos en el estudio (5,6%). Todos los pacientes mostraron una enfermedad prodrómica de 2 a 7 días de duración con fiebre, malestar y dolor de cabeza; 2 también mostraron vómitos y mialgias; y 2 de ellos un efímero rash eritematoso que envolvía tronco y extremidades. Todos ellos presentaron signos y síntomas de inflamación meníngea (fiebre, dolor de cabeza, rigidez de nuca). Ninguno con déficit neurológico (Di Nicuolo y cols., 2005).

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., 1991a) 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 jóvenes, aunque también ocurren en niños (Braito y cols., 1998b).

I.4.4. EPIDEMIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

I.4.4.1. Vectores y reservorios

Phlebotomus perniciosus y *P. perfiliewi* son los vectores reconocidos de VTOS (Verani y cols., 1988). Posteriormente se detectó VTOS en *Sergentomyia minuta* en un estudio realizado en Marsella (Charrell y cols., 2006).

Sanbonmatsu y cols (2005), en un estudio realizado sobre flebotomos capturados en la provincia de Granada encontraron un 70% de *P.perniciosus* y una tasa de infección por VTOS de 0,05%, mucho más baja que la del 0,2% descrita en Italia (Verani y cols., 1988).

VTOS se transmite entre los flebotomos transováricamente y 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). Tras la ingestión de sangre infectada se inicia la multiplicación vírica y se 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 se disemine en el cuerpo de la 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). Es decir, tras la infección oral de la hembra, la transmisión transovárica es más efectiva en el segundo ciclo gonotrófico que en el primero.

Hasta el momento no se conoce reservorio vertebrado para VTOS. No se han descrito ni mamíferos ni aves, aunque se han realizado pocos estudios en este sentido. Sólo se ha descrito el aislamiento de VTOS en el cerebro de un murciélago de la especie *Pipistrellus khuli* (Verani y cols., 1988). No obstante, 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).

Aunque se han aislado *Phlebovirus* de sangre de enfermos y animales salvajes, el papel de los vertebrados en el mantenimiento del ciclo de transmisión de estos virus no está claro. Viremias transitorias y de bajo nivel están presentes en la infección por *Phlebovirus* en humanos y en animales susceptibles de laboratorio. Es más, los flebotomos deben ingerir grandes cantidades de virus para infectarse (Ciufolini y cols., 1985). Verani y colaboradores (1988) examinaron diferentes especies de vertebrados salvajes (ratones de campo, topos, martas, castores, puercoespines, murciélagos, zorros y erizos) y ovejas. Con tests serológicos sólo se demostraron títulos bajos a VTOS en ovejas y ratón de campo, y se consiguió aislar VTOS del cerebro de un murciélago.

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). Distintos estudios se han realizado para determinar los hábitos alimenticios del vector de VTOS más frecuente en España, *P. perniciosus* (Sanbonmatsu y cols., 2005), e identificar los patrones de selección de huéspedes; uno de ellos en 4 áreas geográficas de España : Barcelona, Torvizcón (Alpujarras, Granada), Menorca y El Priorato. Los resultados muestran que, lógicamente estos vectores son oportunistas y se alimentan de los animales a los cuales tienen más fácil acceso. Con algunas preferencias, nunca comen de los pollos, y más frecuentemente de ovejas en sitios dónde hay ovejas y cabras. También exhiben, especial predilección por los perros (Colmenares y cols., 1995). Otro, determinó que tanto *P. perniciosus* como *P. perfiliewi* se alimentaban sobre perros, equinos, ovejas y pájaros además del hombre y dependía más de la disponibilidad que del potencial atractivo de cada una de las especies animales (Bongiorno y cols., 2003).

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:

a) El reservorio: alta enzootia, cronificación de la infección y viremia elevada

b) El vector: densidad de población de flebotomos, proporción de estos portadores del agente infeccioso, expectativa de vida del vector (dependerá de la especie y de las condiciones climáticas, duración del ciclo del virus y hábitos de la especie).

c) El hospedador humano: mayor o menor resistencia a la infección, gravedad de las manifestaciones clínicas, o proximidad del humano al hábitat del vector (viajes, profesiones de riesgo, etc)

d) Otros factores relacionados con la biología (climatología, tipo de vegetación) y la ecología del lugar (presión con insecticidas, etc). Y también con movimientos de población 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, la hace especialmente vulnerable.

I.4.4.2. Distribución geográfica de VTOS

A) España

En España fue descrito por primera vez VTOS como productor de infecciones del SNC en 1988 (Mendoza y cols., 1998). Con posterioridad, se han descrito casos en Almería, Murcia, Alicante y Madrid (Echevarría y cols., 2003)

Estudios serológicos de inmunofluorescencia realizados en distintas áreas de España (Granada, Barcelona, Santiago de Compostela, Las Palmas de Gran Canaria, San Sebastián, Jerez, Murcia, Madrid y Palma de Mallorca) mostraron tasas de anticuerpos entre 11,3% y 61,0%, sobre todo en las provincias del área mediterránea (Mendoza y cols., 1998) Aunque la incidencia real no es bien conocida, se han realizado con posterioridad estudios de prevalencia en Granada, utilizando un test inmunoenzimático comercial para detectar IgG anti.VTOS. La tasa global encontrada fue 24,9% (rango 9,4% en personas <15 años a 60,4% en >65 años). No encontraron diferencias significativas en la distribución por área geográfica de dicha provincia ni por sexo. Sin embargo, hallaron diferencias entre área rural con una tasa de 26,7% frente a área urbana con 20,6% (Sanbonmatsu y cols., 2005).

Posteriormente, se ha publicado un estudio de prevalencia (IgG anti-VTOS mediante EIA) en Madrid comparando 2 períodos: 1993-1994 y 1999-2000. La seroprevalencia global detectada en el primer periodo fue de 7,2%, significativamente mayor que en el segundo que fue de 5,7%. Con respecto a la distribución por grupos de edades variaba desde 1% en menores de 5 años hasta alcanzar el 14,6% en los mayores de 40. Tampoco hubo diferencias por sexo (De Ory y cols., 2007).

Estas tasas de seroprevalencia del 25% en Granada son similares a las encontradas en Italia, otra área endémica; sin embargo, se observan menos casos de enfermedad severa. Una posible explicación puede ser que la cepa VTOS española sea menos neurovirulenta que la italiana.

Estos resultados confirman la circulación de VTOS en España, la elevada prevalencia en algunas zonas de la geografía española, que una considerable proporción de casos deben pasar clínicamente inadvertidos. Por otra parte, las elevadas tasas de prevalencia concurren con la edad han demostrado la exposición de la población de Granada a VTOS a lo largo de la vida y por tanto, la necesidad de estudios en atención primaria para asesorar el papel de dicho virus en enfermedad humana.

B)Otros países europeos

TOSV fue originalmente aislado en 1971 de *Phlebotomus perniciosus* en Monte Argentario, provincia de Grosseto, en Italia central (Verani y cols., 1980). Algunos casos descritos en viajeros y estudios clínicos y epidemiológicos en países del área mediterránea muestran que VTOS tiene tropismo por el SNC y es una de las causas principales de meningitis y encefalitis en los países en los que circula. En Italia central, de hecho es la causa más frecuente de meningitis desde Mayo a Octubre, por encima de los enterovirus y en otros países del norte mediterráneo está entre los 3 más prevalentes en las estaciones cálidas (Charrel, 2008).

B.1.Italia

Las claves apuntando el papel de TOSV en infecciones del SNC en Italia las dieron casos importados descritos en USA y Alemania (Calisher y cols., 1987, Verani y cols.,1980). Un gran estudio desde 1977 a 1988 mostró que el virus era causante de meningitis en dos regiones de Italia: Toscana y Marche, con un pico estacional en Agosto, coincidiendo con la máxima actividad del vector (Nicoletti y cols., 1991). Desde entonces el virus se ha aislado en otras regiones del Centro y Sur de Italia. Y se han realizado estudios como agente etiológico de enfermedades neurológicas en Emilia-Romaña y Piamonte (Francisci y cols., 2003). Valassina y colaboradores en 1996 lo detectaron en 81% de pacientes con meningitis. En un estudio realizado en Siena en niños que vivían en áreas rurales o suburbanas demostraron que VTOS estaba relacionado con un 40% de meningitis o encefalitis (Braitto y cols., 1998b). Un estudio realizado en un periodo de 7 años en Siena mostró que el 52% de los casos de meningitis aséptica estaban relacionados con VTOS (seroconversión, presencia de IgM VTOS, detección PCR) (Braitto y cols., 1998a).

El primer caso de infección por VTOS en Umbria fue publicado en 2003 en el contexto de un estudio retrospectivo de 93 meningitis asépticas y meningoencefalitis. Es de destacar que en el 16% de la población control sana se detectaba IgG anti-VTOS (Francisci y cols., 2003).

B.2.Francia

El primer caso de VTOS adquirido en Francia se describió en un turista alemán que volvía del Sur de Francia (Dobler y cols., 1997). En un estudio de seguimiento de WNV en Sur de Francia, se diagnosticaron 2 casos de meningitis por VTOS (Peyrefitte y cols., 2005) y 2 casos (1 meningitis y 1 síndrome febril) se han descrito recientemente (Hemmersbach-Miller y cols., 2004).

En el Sur de Francia en donantes de sangre y en pacientes con meningitis han demostrado unas tasas de 12% y 18,9% en cuanto a presencia de anticuerpos IgG anti-VTOS respectivamente (De Lamballerie y cols., 2007).

B.3.Chipre

En 1985 a soldados suecos pertenecientes a Naciones Unidas con base en Chipre se les tomó muestras de suero antes y después de 6 meses de estancia. De las 298 parejas de muestras disponibles, sólo hubo una seroconversión a VTOS en un paciente que no mostró manifestaciones clínicas (Eitrem y cols., 1990).

Estudios de seroprevalencia mostraron que el 20% de la población sana mostraba anticuerpos IgG anti-VTOS (Eitrem y cols., 1991a).

B.4.Grecia

En población que vive en Islas Ionian y parte central del país se demostró una seroprevalencia del 60% y 35% respectivamente por ELISA. Sin embargo, no se ha descrito ningún caso de meningitis o encefalitis por VTOS en Grecia (Charrell y cols., 2005).

B.5.Portugal

En el Norte de Portugal en muestras de LCR (106) de meningitis asépticas con estudio de PCR a herpesvirus y enterovirus negativas entre 2002 y 2005 mostraron 5,6% de positivos (6) por un ensayo comercial de nested PCR. Desde un caso descrito en 1985 y otro en 1996, ambos en turistas extranjeros, estos 6 casos son los primeros diagnosticados en habitantes portugueses, y refuerzan la necesidad de estudios de prevalencia en este país (Santos y cols., 2007).

B.6.Alemania

En trabajadores de salud y estudiantes de medicina, detectaron IgG anti-VTOS en 1% de 859 muestras por inmunofluorescencia y 0,7% por enzimoimmunoensayo. IgG anti-VTOS se detectó en 43 muestras de inmunoglobulinas comerciales a títulos de 10-1000 por EIA.

Aunque la prevalencia de anticuerpos anti-VTOS es baja en Alemania, la infección por VTOS debe considerarse en pacientes que regresan de áreas endémicas con síntomas de meningitis (Schwarz y cols., 1995a).

I.4.4.3.Distribución estacional

La infección neurológica es más frecuente durante el verano, con un pico de incidencia en el mes de agosto (Nicoletti y cols., 1991, Navarro y cols., 2004), coincidiendo con la época de máxima actividad del vector.

Todos los estudios concuerdan en la distribución mensual de los casos de infecciones por VTOS en el hombre: el riesgo más alto se ve en Agosto, después Julio y Septiembre y finalmente Junio y Octubre.

I.4.4.4. Riesgo ocupacional

Valassina y colaboradores (2003) publicaron un estudio de seguimiento, utilizando un test inmunoenzimático, de 360 muestras de suero recogidas de población de alto riesgo por su exposición ocupacional a infección por arbovirus y con evaluación anamnésica previa de ausencia de sintomatología neurológica, en 2 regiones de Italia, Toscana y Piamonte. Los sueros se recogieron entre Julio y Agosto del año 2000. Como grupo control recogieron 290 muestras de pacientes que residían en área urbana. En la región de Toscana encontraron una seroprevalencia del 77,2% en los trabajadores forestales, y 22,7% en el grupo control. Estos resultados concuerdan con la observación que la infección es a menudo asintomática o con clínica irrelevante.

Posteriormente, un estudio realizado en la misma región de Toscana, durante el verano de 2001 con 678 muestras de suero (349 agricultores y trabajadores forestales y 329 sujetos control que residían en las mismas áreas) fueron analizados por EIA y mostraron una seropositividad anti-VTOS del 30% en el grupo control y 23% en el grupo de riesgo ocupacional ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que aunque estos trabajadores tienen un potencial mayor de exposición a VTOS (actividades fuera de casa, residencia rural y estilo de vida), estos factores no añaden mayor susceptibilidad a la enfermedad y que se necesitan estudios de medidas preventivas para evitar el riesgo relacionado a las picaduras de flebótomos, especialmente en las personas que viven o trabajan en áreas con riesgo (D´Ovidio y cols., 2008).

I.4.4.5. Variabilidad genética

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.Ph1.3 (Sánchez-Seco y cols., 2003). A nivel de nucleótidos, se observó una diversidad del 19%-20% entre las secuencias obtenidas de las muestras españolas y las de la cepa italiana, mientras que la

homología a nivel de aminoácidos fue del 100%. En cuanto al análisis del gen N se encontró una homología del 100% a nivel de aminoácidos y un 12%-13% de diferencia en las secuencias de nucleótidos entre ambas cepas. Estos resultados indican que al menos circulan 2 linajes de VTOS, Italiana y Española (Sanbonmatsu y cols., 2005). Esta diversidad puede ser parcialmente explicada por las características del vector, ya que se han descrito 2 linajes de *P. perniciosus*, la típica encontrada en Marruecos, Túnez, Malta e Italia y la línea Ibérica. Estas permanecen separadas a causa de que los flebotomos se mueven en saltos cortos, volando como máximo algunos cientos de metros desde sus sitios de descanso (Pesson y cols., 2004).

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 (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. La presencia de estas variantes probablemente sea debida a la naturaleza ARN del genoma viral, así como al ciclo de transmisión huésped-vector (Valassina y cols., 1998). Posteriormente, se ha realizado un estudio de variabilidad genética por secuenciación de una porción del segmento del genoma M que comprende la región que codifica la glicoproteína Gn, de 27 cepas de VTOS aisladas durante 23 años de diferentes localidades y huéspedes (humanos, artrópodos y un murciélago) en Italia. La diversidad encontrada entre aislamientos fue de 0 a 5,7% a nivel de nucleótidos y de 0 a 3,4% a nivel de aminoácidos. El análisis reveló 4 clusters principales. Se demostró, además cocirculación de diferentes cepas en el mismo área y en el mismo periodo de tiempo, tanto para aislamientos de pacientes como ambientales (Venturi y cols., 2007).

Investigadores de Marsella (Charrel y cols. 2007), secuenciaron VTOS aislados de 3 pacientes con meningitis del sureste de Francia, de 2 *P. perniciosus* y de 1 *S. minuta*. De los aislados en pacientes 2 eran similares al genotipo español y 1 similar al italiano; mientras que los detectados en *P. perniciosus* pertenecían al genotipo español y los de *S. minuta* al italiano, como

se muestra en el dendograma realizado tras análisis filogenético de estas cepas (**Figura I.4**). Lo que sugiere una cocirculación de ambos genotipos en áreas intermedias.



Figura I.4.-Secuenciación Gen N de virus Toscana en Francia. Tomado de Charrel y cols., 2007 .

I.4.5. DIAGNOSTICO

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

I.4.5.1. AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR

VTOS es capaz de infectar y producir efecto citopático (ECP) en varias líneas celulares de vertebrados como Vero (riñón de mono verde africano), BHK-21 (fibroblastos de riñón de hamster), CV-1(mono verde africano) entre el 2º y 4º día post-inoculación, y al cabo de 6-7 días en rabdomyosarcoma y LLC-

MK2 (riñón de mono Rhesus). No se observa evidencia de crecimiento en cultivos celulares de *Aedes albopictus* o *A. aegypti* (Verani, y cols., 1984), actualmente *Stegomyia albopicta* y *S. aegypti*, respectivamente (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., 1995b; Valassina y cols., 1996; Sánchez Seco y cols., 2003).

VTOS es sensible a la acción de los disolventes lipídicos tales como el cloroformo, éter o el dietil éter, así como al pH ácido (Beatty y cols., 1995). La actividad hemaglutinina de las glicoproteínas de la envuelta se manifiesta con hematíes de ganso (Valassina y cols., 2003a). 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 VN. Ambos virus, además de presentar diferencias biológicas, presentan diferencias serológicas mediante el test de neutralización de reducción de placas. Existe un alto grado de reactividad cruzada con pruebas como RFC 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 VN 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 retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR), que ha mostrado ser una técnica sensible y específica para el diagnóstico de infección neurológica por VTOS. Se han descrito diferentes estrategias de amplificación: RT-PCR nested o secuencial, múltiple o genérica. En 1995, Schwarz y colaboradores describieron un método de RT-PCR secuencial específica para VTOS, con cebadores dirigidos frente al segmento S, que mostró ser sensible y específico (Schwarz y cols., 1995b). Basándose en el mismo principio, Valassina y colaboradores diseñaron otra RT-PCR secuencial, en la que la diana también era un fragmento del segmento S del VTOS, que fue capaz de detectar ARN 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 a 11 cepas de VTOS aisladas en España no consiguió amplificar ARN de ninguna de ellas (Sánchez-Seco y cols., 2003). Por ello, se diseñó otra técnica RT-PCR secuencial y genérica, que fuese capaz de amplificar el genoma de cualquier *Phlebovirus*, usando como cebadores oligonucleótidos degenerados cuya diana es un fragmento conservado del segmento L. Posteriormente se secuenció el fragmento amplificado para identificar a qué virus pertenece. Con esta técnica tanto las cepas españolas como las italianas fueron detectadas (Sánchez-Seco y cols., 2003). Con posterioridad se ha publicado un ensayo RT-PCR a tiempo real que detecta ambos genotipos de VTOS (Perez Ruiz y cols., 2007).

Otra estrategia muy interesante es la PCR múltiple que permite detectar de manera simultánea varios virus distintos. Consiste en mezclar cebadores dirigidos frente al genoma de virus de distintas especies en un mismo tubo de reacción, y que rinden fragmentos de amplificación de distinto tamaño de manera que los productos de amplificación puedan distinguirse mediante electroforesis en agarosa. Recientemente se ha descrito un ensayo Taqman RT-PCR para los *Phlebovirus* de mayor importancia patógena: VN, VS, VTOS y RVFV. Este ensayo detecta aislamientos recientes de RVFV y VTOS de África y España, respectivamente (Weidmann y cols., 2008).

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 RT-PCR secuencial doble para detección de enterovirus y VTOS (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 y cols., 1996).

I.4.5.3. DIÁGNÓSTICO SEROLÓGICO

El diagnóstico de infección aguda se basa en la detección de IgM específica fundamentalmente en suero, aunque también puede utilizarse en LCR, por demostración de producción intratecal de anticuerpos específicos IgG.

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. Anticuerpos IgG anti-VTOS probablemente persistan de por vida, es posible que, en áreas endémicas reinfecciones periódicas actúen como efecto “booster” para la inmunidad (Magurano y Nicoletti, 1999).

Tanto para detectar IgG como IgM existen pruebas inmunoenzimáticas comerciales. Las técnicas inmunoenzimáticas, que usan como antígeno nucleoproteína recombinante de VTOS, 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 el 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 VN y VS, sobre todo con este último.

Clásicamente se han utilizado para diagnóstico serológico la RFC, inmunofluorescencia y técnicas de neutralización de reducción de formación de placa, inhibición del ECP o IH. Además de tratarse de pruebas mucho más laboriosas y costosas que el ELISA, la RFC, IH e inmunofluorescencia han mostrado poca especificidad a la hora de distinguir entre los virus de la fiebre de los flebotomos, produciéndose reacciones cruzadas importantes entre VTOS, VN, VS y Tehran (Tesh y cols., 1982). Estudios basados en ensayos de RFC e IF muestran que VTOS está más relacionado antigénicamente con VN que con VS.

La prueba de neutralización de reducción de placa es mucho más específica que las anteriores (Tesh y cols., 1982), aunque muy 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 VS, VFVR, pero sobre todo con VN que es antigénicamente muy parecido a VTOS.

Ensayos de inmunoblot y RIPA han demostrado que la nucleoproteína N se comporta como el mayor antígeno responsable para las respuestas IgG e IgM. Anticuerpos frente a glicoproteínas sólo se pueden demostrar por RIPA y en un tercio de los pacientes y su presencia siempre predice neutralización, pero existen muestras con actividad neutralizante que no muestran niveles detectables de anticuerpos G1 y G2 (Di Bonito y cols., 1999).

II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Hasta la fecha, VTOS sólo se ha asociado a cuadros neurológicos pero se desconoce si participa en otros procesos patológicos, de forma similar a lo que sucede con otros virus de la misma familia como VN y VS. Estudios de seroprevalencia llevados a cabo dentro del subproyecto Toscana de la Red EVITAR en la provincia de Granada muestran una tasa de infección por VTOS muy alta (cercana al 60% de la población mayor de 65 años), que aumenta progresivamente con la edad (Sanbonmatsu y cols, 2005); lo que pone de manifiesto que esta provincia tiene una alta endemicidad de VTOS y que básicamente se trata de un virus cuya infección es en gran medida asintomática o con patología leve, que sólo en algunos casos requiere ingreso hospitalario.

El ciclo biológico de VTOS en nuestro medio es desconocido. Dentro del subproyecto Toscana de la Red EVITAR como parte de sus objetivos se ha identificado el flebotomo vector (Sanbonmatsu y cols, 2005), no obstante se desconoce si puede existir algún huésped que actúe como reservorio de VTOS, permitiendo su persistencia durante las amplias temporadas en que no existe circulación de flebotomos, como sucede con otros arbovirus.

Por ello, los **objetivos** del presente trabajo son los siguientes:

1.- Determinar la implicación de VTOS en **patología humana** en cuadros no neurológicos, con especial vigilancia de procesos clínicos leves atendidos en atención primaria, durante los meses de verano.

2.- Establecer la posible implicación de animales domésticos en el ciclo biológico de VTOS:

2-A: Estudio de seroprevalencia de infección por VTOS en animales domésticos.

2-B: Búsqueda de posibles reservorios de VTOS en animales domésticos, que puedan perpetuar su presencia en nuestro medio.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ESTUDIO DE PATOLOGÍA NO NEUROLÓGICA VTOS

III.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y PERIODO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio prospectivo de serie de casos, en el que se incluyeron pacientes atendidos en atención primaria y consultas externas del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, de mayo a octubre durante 2 años consecutivos (2006 y 2007), que cumplían los siguientes criterios de inclusión: síndrome febril agudo de menos de tres días de evolución, infección respiratoria aguda, artritis o exantema de etiología no filiada y que aceptaron participar en el estudio mediante consentimiento informado (la hoja de información al paciente, así como el consentimiento informado se adjuntan en el anexo 1). Se excluyeron aquellos en los que se determinó otra etiología causante del cuadro clínico. La detección de casos humanos se realizó por facultativos (Médicos de familia y Pediatras) de Centros de Salud del Área Sanitaria Norte de Granada, de Granada capital y de las Consultas externas del Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

Se obtuvo una muestra de sangre en tubo sin aditivos. En la muestra se realizó serología IgG e IgM frente a VTOS.

Además, de la muestra de suero se separó una alícuota de 200 μ L, para confirmación de resultado en caso de IgM positiva para VTOS.

Estas técnicas se realizaron en el Laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario "Virgen de las Nieves " de Granada.

III.1.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG/IgM VTOS

Las determinaciones serológicas tanto de IgG como IgM se efectuaron mediante técnicas de enzimoimmunoanálisis utilizando el Kit Enzywell Toscana virus (Diesse, Italia). La sensibilidad diagnóstica para el análisis de IgG es del 95% (IC del 95%: 83,5%-98,6%) y la especificidad del 96,5% (IC del 95%: 88,1%-99%) (Soldateschi y cols, 1999). En el caso de la prueba para IgM la

sensibilidad es del 100% (IC del 95%: 83,2-100%) y la especificidad del 100% (IC del 95%: 95,3-100%).

Las muestras se diluyen 1:101 (10 μ L de suero en 1 mL de tampón de dilución). De estas diluciones se dispensan 100 μ L por pocillo.

El procedimiento para la **detección de IgG** es el siguiente: incubación de la muestra de suero sobre una fase sólida (pocillo de una placa microtiter) recubierta de la nucleoproteína de VTOS, antígeno viral recombinante (Nr) 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 cromógeno, tetrametilbenzidina, a 0,26 mg/mL, y peróxido de hidrógeno al 0,01%, hace que la solución vire a azul en presencia de peroxidasa. Por último se añade 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 (sin filtro de referencia).

En el caso de la **determinación de IgM**: el suero se incuba sobre una fase sólida recubierta en este caso de anticuerpo monoclonal anti-IgM humano. Si la muestra contiene IgM anti-VTOS quedarán unidas a la fase sólida y en la siguiente incubación al complejo antígeno recombinante de VTOS – conjugado (de preparación extemporánea). Posteriormente, se añade igualmente el sustrato cromógeno que desarrollará el color en caso de positividad y la solución de frenado, para posterior lectura de la DO_{450} .

En cada ensayo se incluye un pocillo de control negativo, un control positivo, dos controles de “punto de corte” y un pocillo de “blanco” (100 μ L de sustrato). Una vez añadido el suero la placa microtiter se cubre con un film protector y se incuba durante 45 min a 37°C. Tras la incubación se lava cuatro veces con 300 μ L de solución de lavado por pocillo. Se añaden 100 μ L del conjugado a cada pocillo y se vuelve a tapar la placa e incubar durante otros 45 min a 37°C. Se repite la operación de lavado de los pocillos 4 veces, como se indica anteriormente y se dispensan 100 μ L de sustrato en cada pocillo. Tras una incubación de 15 min a temperatura ambiente se frena 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.

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 se analizaron de nuevo, y si tras la repetición el resultado vuelve a ser dudoso, se considerará como negativo a efectos de cálculos estadísticos.

III.2. ESTUDIO DE PRESENCIA DE VTOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

III.2.1. MUESTRAS

III.2.1.1. ANIMALES Y PERIODO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio descriptivo transversal (prevalencia).

En un laboratorio de análisis veterinarios (ANLAVE, Granada) se recolectaron las muestras de suero de perros, gatos y caballos.

A la vez y gracias a la colaboración del Laboratorio de Sanidad Animal de Santa Fe (Granada), en donde se realizan los controles zoonosológicos del área metropolitana de Granada, se obtuvieron los correspondientes a cabras, ovejas, vacas y cerdos. Se estudiaron animales de cabañas ganaderas de medio rural cercano a domicilios de pacientes que habían tenido infección conocida por VTOS en la provincia de Granada o de áreas en las que se había detectado previamente VTOS en flebotomos. Los municipios seleccionados fueron: Alfacar, Atarfe, Beas, Cogollos-Vega, Dilar, Gabias, Güejar-Sierra, Huetor-Santillán, Huetor-Vega, Monachil, Peligros, Pinos-Puente, Víznar y La Zubia.

Las muestras de los animales se obtuvieron durante los meses de octubre a mayo de los años 2006 y 2007, periodo de tiempo en el que la circulación de flebotomos es mínima en nuestro medio.

A los animales seleccionados, se les extrajo una muestra de suero, y se separaron tres alícuotas de 100 µL: una alícuota se utilizó para estudio de seroprevalencia en animales mediante inmunofluorescencia, y las 2 restantes se utilizaron para estudio de posibles reservorios, una se inoculó para cultivo de virus, y la otra se congeló en 400 µL de buffer AVL (incluido en el kit de extracción de ARN, ver más adelante apartado III.2.2.2.B), para la realización de RT-PCR.

Todos las técnicas se realizaron en el Laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

III.2.2. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

III.2.2.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El esquema de procesamiento de las muestras de suero de los animales seleccionados fue el que se indica en la **Figura III.1**.

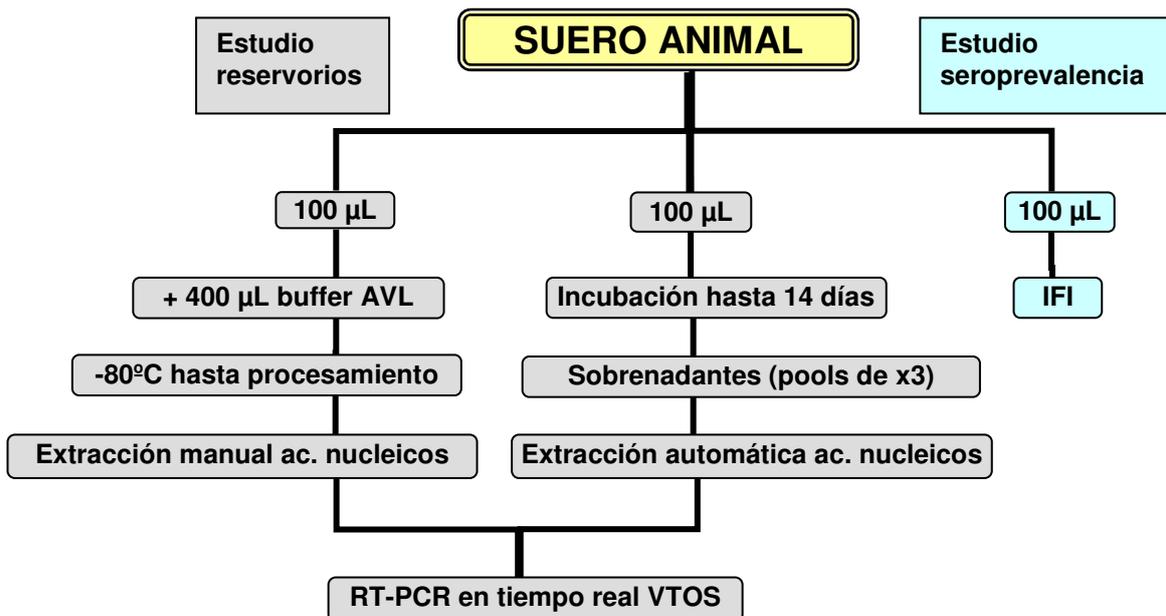


Figura III.1. Procesamiento de las muestras de suero animal

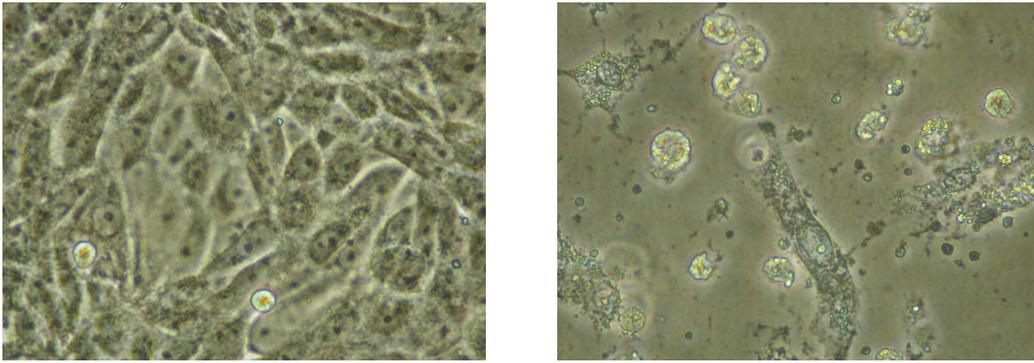
III.2.2.2.MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

III.2.2.2.A. 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 Granada, utilizando una línea celular heteroploide: Vero (riñón de mono verde africano) (**Figura III.2**). Esta línea se mantiene 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).

Semanalmente se preparaban tubos de células Vero para inoculación de los sueros, 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).

Tras descartar el medio de mantenimiento del tubo con la línea celular se inocularon 200 μ L de suero, que se dejaron adsorber sobre las monocapas durante una hora a 35°C. Posteriormente a cada tubo se añadieron 2 mL de MEM sin SFB. Las muestras así inoculadas se incubaron a 35°C durante 14 días en gradillas que mantenían una inclinación de 15° (Clarke y cols., 1992). La aparición de efecto citopático (ECP) (**Figura III.2**) se observó cada 48 h utilizando un microscopio invertido y con un objetivo de 4X. En los cultivos que manifestaron algún efecto citopático sospechoso de infección por *Phlebovirus* y en los cultivos negativos tras los 14 días de incubación, se congeló 1 mL del sobrenadante a -80°C para posterior investigación de VTOS mediante RT-PCR (ver apartado III.2.2.2.B) Dicha técnica se realizó inicialmente agrupando los sobrenadantes en pools de tres muestras.



A

B

Figura III.2. Línea celular Vero. A: previo a la inoculación de muestra y B: efecto citopático producido por virus Toscana (tras 7 días de incubación)

III.2.2.2.B. MÉTODOS MOLECULARES

***Extracción de ácidos nucleicos**

I) Muestras de sueros

Para la extracción de ARN de los sueros de animales congelados en buffer AVL se utilizó el kit comercial Qiamp Viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

Este método de extracción está basado en la capacidad de las membranas de silica gel de unir selectivamente ARN, junto con la velocidad de centrifugación. La lisis de la muestra se realiza bajo condiciones desnaturizantes para inactivar las ribonucleasas. Para aumentar el rendimiento de extracción de ARN, el buffer de lisis incluye además “carrier de ARN”.

Tras descongelar la muestra (suero + buffer AVL), se realizó la lisis durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 400 μ L de etanol absoluto. Se transfiere toda la solución a la columna Qiamp. Se centrifuga a 8000 x g durante 1 min, 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 50 μ L de tampón

AE, que se añaden a la columna y se centrifuga a 8000 x g durante 1 min. El líquido eluído contiene el ARN extraído de la muestra. Éste se conservó a 4°C hasta 24 h y si el tiempo de procesamiento fue mayor, a -80°C (**Figura III.3**).

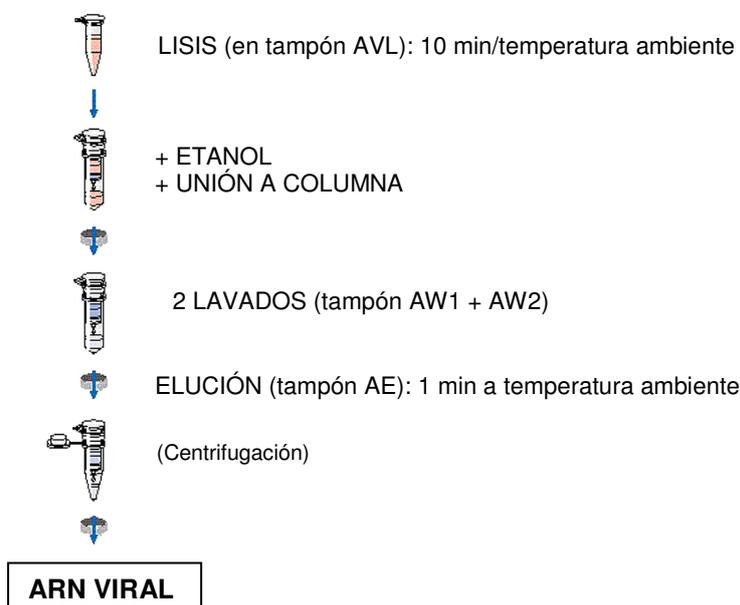


Figura III.3. Esquema del procedimiento de extracción manual de ARN viral

II) Sobrenadantes de cultivo celular

Se utilizaron 100 μ L de cada sobrenadante, previamente congelado, y se agruparon en pools de 3. La extracción de ARN de cada pool se realizó mediante el sistema automático Nuclisens easyMAG (BioMérieux, Lyon, Francia). La muestra se somete primero a lisis y unión de partículas de sílice magnética a los ácidos nucleicos liberados tras la lisis. A la cubeta de reacción se une un imán que captura las partículas de sílice unidas a los ácidos nucleicos. Durante este proceso, se realizan diversos lavados para eliminar el buffer de lisis y productos de desecho de la extracción. En el paso final, tras la adición del buffer de elución y calentamiento de la cubeta, se liberan a ésta los ácidos nucleicos puros en el volumen que se le haya programado.

Brevemente la técnica es la siguiente:

1º Los 300 μ L de cada pool de los sobrenadantes de cultivo se incubaron 10 min a temperatura ambiente con 1 mL de buffer de lisis (suministrado con el kit).

2º El volumen total de esta solución se transfirió a las cubetas de reacción y se les añadieron 100 µL de sílice magnética. Se programó el instrumento para extracción con lisis previa externa, partiendo de 300 µL de muestra y eluyendo en 50 µL los ácidos nucleicos extraídos.

* **Amplificación de ácidos nucleicos**

La amplificación específica de VTOS en las muestras de ARN previamente extraídas se realizó mediante RT-PCR en tiempo real, que amplifica un fragmento de 89 pb del extremo conservado 3' del segmento S (pequeño del genoma del virus (Pérez-Ruiz y cols, 2007).

El procedimiento seguido fue el siguiente: la muestra extraída se sometió a retrotranscripción (RT) utilizando el kit comercial iScript™ cDNA synthesis (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA), que sintetiza ADN complementario con cebadores random. Para ello, a 10 µL del ácido nucleico se le añadieron 5 µL de agua, 4 µL del tampón de RT (5X) y 1 µL de enzima retrotranscriptasa, en un tubo de PCR de 0,2 ml de pared fina. La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA): 30 min a 37°C, y posterior inactivación de la enzima durante 5 min a 85°C.

Para la amplificación de VTOS, a 6 µl del ADNc previamente sintetizado se le añadieron 4 µL del reactivo LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), 1 µL de cada cebador *sense* y *antisense* (concentración final 0,5 µM), y 2 µL de la sonda taqman marcada con fluoresceína (concentración final 0,2 µM). Esta mezcla de reacción se preparó en un capilar para PCR en tiempo real. La reacción se llevó a cabo en el aparato LightCycler 2.0 según el siguiente protocolo: 10 min a 95°C, y 45 ciclos de 5 seg/95°C y 20 seg/60°C (hibridación de cebadores y extensión de la cadena por la Taq DNA polimerasa). La lectura de la fluorescencia se realizó en cada ciclo de PCR tras el paso de extensión. En cada PCR se incluyó un control negativo (agua) y un control positivo (cepa VTOS genotipo español), incluidos desde la extracción.

Tras la PCR se realizó cuantificación de la curva de fluorescencia y se midió el ciclo umbral de detección (Cp, “crossing point”) de cada muestra y control. La determinación se validó si el control negativo no daba valor de Cp y el control positivo daba una amplificación con un valor de Cp entre 18 y 38. Igualmente, se consideró positiva aquella muestra en la que se obtenía una curva de fluorescencia y un Cp entre 18 y 38 (**Figura III.4**).

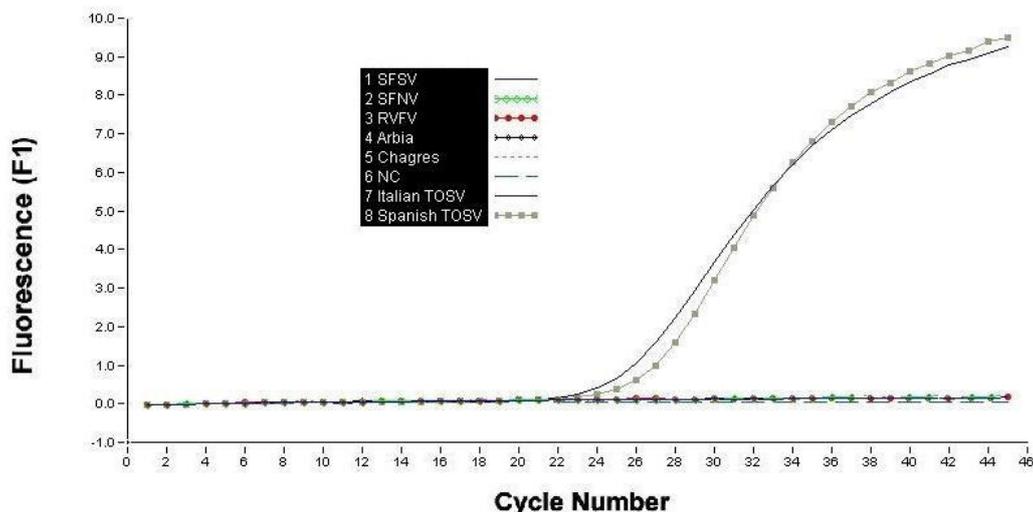


Figura III.4. Curvas de fluorescencia de VTOS genotipos italiano y español (muestras 1-6, otros *Phlebovirus* y control negativo)

III.2.2.2.C. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA. ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA

Se utilizó una prueba de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos VTOS en las distintas especies de vertebrados. Para ello se infectó un frasco de 250 mL con células Vero con una cepa de VTOS genotipo español (VTOS 62100) y se incubaron durante tres días hasta la observación de ECP.

Preparación de las extensiones: Se despegaron las células de la pared del frasco con una espátula (scraper) de plástico sin tirar el medio de cultivo, el contenido se distribuyó en tubos de centrifuga de 50 mL, y se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos. Tras decantar el sobrenadante se resuspendieron las células del sedimento de cada tubo en 5 mL de tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores.

Posteriormente se descartó el sobrenadante, dejando sólo 2 mL del mismo en el que se resuspendieron las células.

En portaobjetos para fluorescencia (18 pocillos), se depositaron 10 µL en cada pocillo de la suspensión celular anterior. Tras dejar secar el porta se fijaron en acetona a -20°C. Los portas se guardaron a -80°C hasta su uso.

Reacción de Inmunofluorescencia: Se colocaron 10 µL. de la dilución de trabajo de suero de cada una de las especies en cada pocillo, y se incubó durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Se lavó en agitación ligera con PBS pH=7,2 durante 10 min. Sin dejar secar totalmente, se añadieron 10 µL de cada una de las antiglobulinas según la especie (Tabla III.1.). Se repitió la operación de lavado en las mismas condiciones y tras dejar secar se añadió el medio de montaje, glicerina tamponada, y se colocó un cubreobjetos para observar la preparación en microscopio de fluorescencia a 400x. En cada ensayo se incluyó un control negativo (PBS pH=7,2).

Dilución de trabajo de los sueros: Para cada una de las especies se determinó la dilución de trabajo realizando diluciones seriadas a partir de 1:10 (10 µL de suero problema + 90 µL de PBS pH=7,2) y doblediluyendo en PBS pH=7,2 hasta 1:320. Se realizó en células sin infectar. Se eligió la dilución de trabajo de cada especie de vertebrado como aquella en la que se dejaba de observar fluorescencia residual inespecífica (ver **Tabla III.1**) en las células no infectadas.

Como referencia de patrón de fluorescencia típico, se utilizó el observado en portas de células infectadas frente a no infectadas, utilizando 3 sueros humanos positivos conocidos, de nuestra seroteca. (**Figuras III.5**).

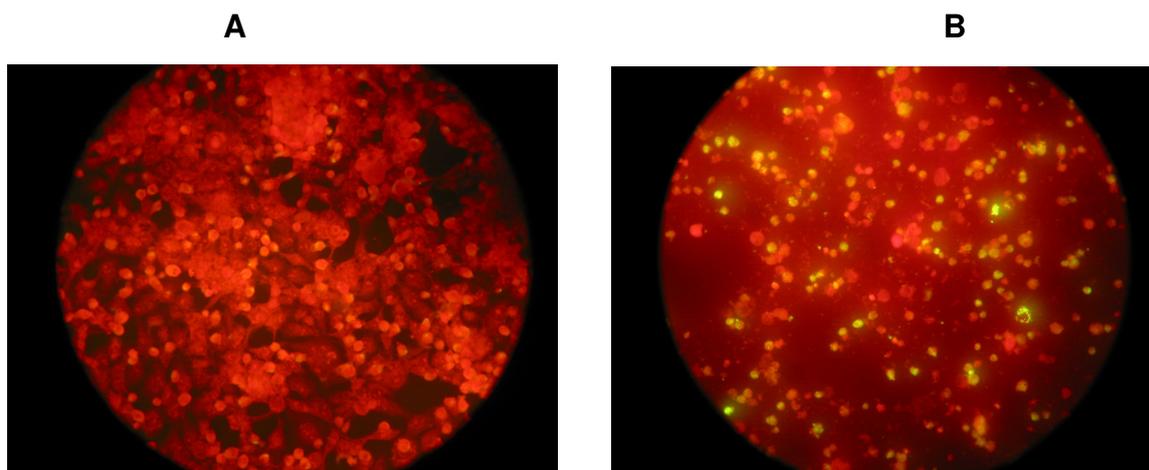


Fig III.5. A. Patrón de fluorescencia observado en portas de células no infectadas (A) frente a infectadas (B), utilizando 3 sueros humanos positivos frente a VTOS

Las muestras de suero que presentaban patrón de fluorescencia típico a la dilución empleada se consideraron positivas para anticuerpos frente a VTOS.

TABLA III.1. Diluciones de trabajo de los sueros animales para IF y antiglobulina usada

| ANIMAL | DILUCIÓN | ANTIGLOBULINA |
|---------|----------|--|
| Vaca | 1:20 | Anti-Bovine IgG _{1,2} polyclonal antiserum FITC (goat) ¹ |
| Cabra | 1:80 | Anti-Goat IgG polyclonal antiserum FITC (rabbit) ¹ |
| Cerdo | 1:20 | Anti-Pig IgG polyclonal antiserum FITC (rabbit) ¹ |
| Oveja | 1:80 | Anti-Sheep IgG antiserum FITC (rabbit) ² |
| Gato | 1:20 | Anti-Feline IgG(H+L)-FITC conjugate ³ |
| Caballo | 1:40 | Anti-Equine IgG(Fc)-FITC conjugate ³ |
| Perro | 1:20 | Dog IgG(H+L)-FITC conjugate ³ |

1:VMRD (Pullman WA); 2:BETHYL Lab (Fullerton CA); 3:Fuller Lab (Fullerton CA)

III.3.REGISTRO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

III.3.1.ESTUDIO DE PATOLOGÍA NO NEUROLÓGICA EN HUMANOS

TAMAÑO DE MUESTRA:

Como desconocíamos la proporción de casos positivos para el cálculo del tamaño muestral, asumimos la situación estadísticamente más desfavorable (entorno al 50%). En este caso para estimar la proporción

poblacional con una confianza del 95% y una precisión de un 10% necesitábamos unos 96 individuos. Si queremos que la precisión sea del 7% necesitábamos 196 individuos y para obtener una precisión del 5% necesitábamos 384 individuos.

Se consideró óptima la obtención de una muestra mínima en todo el periodo de estudio de 150 pacientes.

VARIABLES:

Dependiente: Resultado del diagnóstico microbiológico (positivo VTOS /negativo VTOS).

Se consideró un **resultado positivo** para estudio de prevalencias cuando se detectó IgG anti-VTOS en la muestra de suero y para diagnóstico de un determinado proceso clínico cuando se detectó IgM VTOS en la muestra de suero

Independientes: Datos clínicos, epidemiológicos y demográficos (ver ficha clínico-epidemiológica en anexo 2).

RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS:

A todos los pacientes seleccionados, previo consentimiento informado (anexo 1), se les realizó ficha de obtención de datos clínico-epidemiológicos (anexo 2) que se registraron en base de datos (MS Access, Office XP) para posteriores estudios estadísticos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizó con el fin de estimar la proporción de pacientes en los que la etiología del síndrome clínico era el VTOS con estimación puntual e intervalo de confianza del 95%.

Además se hizo estadística descriptiva de los datos clínico-epidemiológicos. Posteriormente se estudió si había diferencias significativas de estas variables entre el grupo de pacientes con IgG o IgM positivas a VTOS

y los que no. Las variables cuantitativas se compararon mediante el test de la "t de Student" o test no paramétricos cuando fue necesario. Las variables cualitativas se compararon mediante el test de chi-cuadrado.

El programa estadístico utilizado fue SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

III.3.2. ESTUDIO DE VTOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS:

A todos los animales seleccionados, se les realizó ficha de obtención de datos epidemiológicos que se registraron en base de datos (MS Access, Office XP). Los datos registrados fueron: especie animal, origen, fecha ,

VARIABLES:

Dependientes: Resultado microbiológico (VTOS positivo/negativo).

Se consideraron positivos en el estudio de prevalencias a aquellos sueros con IF positiva a la dilución adecuada a la especie de que se tratara.

En el estudio de posibles reservorios, se consideró positivo todo suero en el que se aisló en cultivo o se detectó mediante RT-PCR VTOS

Independientes: Datos demográficos y epidemiológicos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizó con el fin de estimar la proporción de animales con serología positiva a VTOS con estimación puntual e intervalo de confianza del 95%.

Además se hizo estadística descriptiva de los datos demográficos y epidemiológicos.

El programa estadístico utilizado fue SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

ANEXO 1

HOJA DE INFORMACIÓN A PACIENTES SOBRE ESTUDIO DE PATOLOGÍA NO NEUROLOGICA Y HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE O SU REPRESENTANTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: "Implicación de Virus Toscana como patógeno humano en procesos no-neurológicos y detección de posibles reservorios en la provincia de Granada"

AVISO: Esta hoja de información puede estar utilizando algunas palabras que Ud. no comprenda. Por favor, pida que el médico o el personal del estudio le expliquen cualquier palabra o información que Ud. No entienda claramente.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

El virus Toscana está implicado en procesos patológicos en el hombre, principalmente en forma de meningitis. En la provincia de Granada, un elevado número de individuos tienen anticuerpos frente a este virus, lo que indica que además de cuadros neurológicos, debe producir otro tipo de patologías, leves e incluso asintomáticas. Este virus se transmite al hombre por la picadura de un mosquito, el flebotomo, muy común en nuestro medio. Este mosquito aparece sólo en los meses de verano. Es por ello, que las meningitis por virus Toscana hasta ahora descritas se han diagnosticado sólo en estos meses.

La finalidad de este estudio es: conocer la implicación real de virus Toscana en procesos no neurológicos.

DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio persigue la investigación de virus Toscana en pacientes con fiebre aguda de origen desconocido en los meses de verano, de mayo a octubre.

El estudio es muy sencillo, y no se refiere a ningún tratamiento, sino a la recogida de muestras clínicas para análisis. En realidad, no se le realizará a Ud. ninguna prueba clínica o exploración específica adicional a las que médicamente se consideran como de realización rutinaria en un caso como el suyo.

En el momento de diagnóstico (fase aguda de la enfermedad) se obtendrá una muestra de sangre (mediante punción de una vena del antebrazo). Una parte de la muestra se guardará para ulteriores análisis microbiológicos propios de este estudio.

PARA QUÉ SE LE SOLICITA A UD. EL CONSENTIMIENTO INFORMADO

1º Para que Ud. consienta en que una pequeña porción de su sangre sea enviada al laboratorio en el que se realizarán los diversos estudios de investigación.

2º Para que Ud. consienta en que esas muestras queden guardadas en ese laboratorio para la eventual realización futura de nuevos estudios

(exclusivamente relacionados con el tema de esta investigación) si se considera oportuno.

RIESGOS E INCONVENIENTES

1º Ninguno en cuanto al estudio en sí mismo.

2º Los propios de la extracción sanguínea, que en realidad son mínimos, aunque inevitables en cuanto que forman parte de la práctica médica habitual y son imprescindibles para el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad.

BENEFICIOS

1º Como resultado de este estudio, es posible que pueda llegar a determinarse la causa exacta de la enfermedad que Ud. padece, de la cual Ud. será oportunamente informado. Esto constituirá un beneficio para Ud. y también para su atención médica actual o futura.

2º Del posible descubrimiento de un nuevo virus como causa de su enfermedad se podrían seguir repercusiones epidemiológicas y sociales importantes.

CONFIDENCIALIDAD

La información obtenida del estudio será recogida en formulario para su ulterior almacenamiento informatizado en una base de datos con un número de código para cada caso. Ni su nombre ni ningún otro de sus datos personales aparecerán en ningún escrito ni publicación.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Si por cualquier razón Ud. no deseara participar en este estudio, ello no influirá de ningún modo en el trato y calidad asistencial que por su enfermedad Ud. requiera.

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

TÍTULO DEL ESTUDIO: :”Implicación de Virus Toscana como patógeno humano en procesos no-neurológicos y detección de posibles reservorios en la provincia de Granada”

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 ulteriores 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

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

- 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

5.17. IgG Neg Pos

- CULTIVO

5.18. Cultivo en células Vero Neg Pos

- PCR (si procede)

5.19. RT-PCR TOSCANA Neg Pos

IV. RESULTADOS

IV.1. ESTUDIO DE PATOLOGÍA NO NEUROLÓGICA VTOS

IV.1.1. DATOS DESCRIPTIVOS

En base a lo expuesto anteriormente se consideró óptima una muestra mínima de 150 pacientes en todo el período de estudio.

En total se analizaron 358 sueros del mismo número de pacientes, correspondiendo 329 al año 2006 y 29 al año 2007. Para evaluar la distribución de la muestra por edad, esta variable se estratificó en cuatro grupos, como se muestra en la **Tabla IV.1**. En 127 de los mismos no se tuvo acceso a este dato, por lo que a efectos de edad no se contabilizaron, y se realizaron los cálculos sobre un total de 231.

Tabla IV.1. Distribución por edades de los sueros para estudio de patología no neurológica

| Edad | Valor | Porcentaje |
|---------------------|--------------|-------------------|
| 0-14 años | 63 | 27,3 |
| 15-40 años | 90 | 39 |
| 41-65 años | 52 | 22,5 |
| > 65 años | 26 | 11,2 |
| TOTAL | 231 | 100 |

Respecto a la distribución por **sexo**, se trataba de 156 mujeres (43,6%) y 202 hombres (56,4%).

Los síndromes clínicos estudiados se agruparon para su análisis en: síndrome febril (SF), n=299 (83,5%), infección respiratoria aguda (IRA) n= 53 (14,8%), exantemas (E), n=4 (1,1%) y artritis (A), n=2 (0,6%).

Los sueros fueron recogidos, de mayo a septiembre, periodos de máxima actividad del flebotomo. La distribución por **meses** se muestra en **Tabla IV.2**.

Tabla IV.2.- Distribución por meses de los sueros para estudio de patología no neurológica

| Meses | Número | Porcentaje |
|-------------------|---------------|-------------------|
| MAYO | 51 | 14,2 |
| JUNIO | 64 | 18 |
| JULIO | 125 | 35 |
| AGOSTO | 71 | 19,8 |
| SEPTIEMBRE | 47 | 13 |
| Total | 358 | 100 |

La distribución de muestras por **procedencia**, se recoge en la **Tabla IV.3.**

Tabla IV.3.- Distribución por procedencia de los sueros para estudio de patología no neurológica

| Procedencia | Número | Porcentaje |
|--|---------------|-------------------|
| Consulta externa hospital | 232 | 64,8 |
| Centro de Salud Granada capital | 57 | 15,9 |
| Centro de Salud Área Norte | 69 | 19,3 |
| Total | 358 | 100 |

IV.1.2. RESULTADOS DE IgG ANTI-VTOS

De las 358 muestras de suero, 73 fueron positiva para IgG anti-VTOS (20,4%). La distribución de los resultados positivos y negativos para IgG anti-VTOS por **edad y sexo** se muestra en las **Tablas IV.4 y IV.5**, respectivamente.

Tabla IV.4.- Resultados de IgG anti-VTOS distribuidos por grupos de edad

| Edad | IgG anti-VTOS (-) [n(%)] | IgG anti-VTOS (+) [n(%)] | Total |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
| 0-14 años | 60 (95,2) | 3 (4,8) | 63 (100) |
| 15-40 años | 73 (81,1) | 17 (18,9) | 90 (100) |
| 41-65 años | 38 (73,1) | 14 (32,6) | 52 (100) |
| >65 años | 17 (65,4) | 9 (34,6) | 26 (100) |
| TOTAL | 188 (81,4) | 43 (18,6) | 231 (100) |

P=0,002; (-)=negativa; (+)=positiva

Tabla IV.5.- Resultados de IgG anti-VTOS distribuidos por sexo

| Sexo | IgG V anti-VTOS (-) [n(%)] | IgG anti-VTOS (+) [n(%)] |
|--------------|----------------------------|--------------------------|
| Femenino | 122 (42,8) | 34 (46,6) |
| Masculino | 163 (57,2) | 39 (53,4) |
| TOTAL | 285 (100) | 73 (100) |

p= 0,598; (-)=negativa; (+)=positiva

Se observaron diferencias significativas ($p= 0,002$) en los resultados de IgG anti-VTOS según la **edad**. Se observa un aumento de la tasa de anticuerpos conforme aumenta la edad (18,9% en el grupo de 15-40 años de edad que se incrementa al 32,6 y 34,6 en los grupos de 41 a 65 años y más de 65 años respectivamente). El análisis estadístico demostró que esta diferencia se debe a un menor porcentaje de positivos en la edad pediátrica (menores de 15 años).

Los resultados de IgG anti-VTOS por **sexo** no demostraron diferencias significativas ($p= 0,598$).

La distribución de los resultados de IgG anti-VTOS respecto a la **patología** estudiada se muestra en la **Tabla IV.6**.

Tabla IV.6.- Resultados de IgG anti-VTOS en función del síndrome clínico

| Síndrome clínico | IgG anti-VTOS (-) [n(%)] | IgG anti-VTOS(+) [n(%)] | Total |
|------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|
| SF | 232 (77,6) | 67 (22,4) | 299 |
| IRA | 49 (92,5) | 4 (7,5) | 53 |
| E | 3 (75) | 1 (25) | 4 |
| A | 1 (50) | 1 (50) | 2 |
| TOTAL | 285 (100) | 73 (100) | 358(100) |

p= 0,064; SF, síndrome febril; IRA, infección respiratoria aguda E, exantema; A, artritis (-)=negativa; (+)=positiva

El análisis estadístico no demostró diferencias significativas en la detección de IgG anti-VTOS según la patología.

IV.1.3. RESULTADOS DE IgM ANTI-VTOS

De las 358 muestras de suero, sólo 1 fue positiva para IgM VTOS (0,3%).

El resultado de IgM anti-VTOS positivo, correspondió a una mujer de 45 años procedente del área norte de Granada (C.S. Iznalloz), que se detectó en julio de 2006.

La paciente, acudió a su médico de cabecera por presentar exantema generalizado, sin otros signos ni síntomas de interés. Tampoco mostró signos neurológicos asociados al exantema. En el momento de la consulta se le extrajo suero para determinaciones microbiológicas. Los resultados de la serología de rutina frente a microorganismos productores de exantema, *Parvovirus B19*, *Rickettsia conorii*, virus del sarampión y virus de la rubéola, realizados en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario "Virgen de las Nieves", fueron negativos. La paciente acudió a revisión a la semana, mostrando resolución del cuadro, sin complicaciones.

IV.2. ESTUDIO DE VTOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

IV.2.1. DATOS DESCRIPTIVOS

Se recolectaron un total de 1186 sueros de todas las especies animales consideradas en el estudio. De ellos, eran 213 (18%) gatos, 286 (24,1%) perros y 14 (1,2 %) caballos recogidos del laboratorio de análisis veterinario ANLAVE que realiza determinaciones en toda la provincia de Granada.

La **Tabla IV.7** muestra la procedencia de los sueros de gatos, perros y caballos en la provincia de Granada.

Tabla IV.7.- Poblaciones de procedencia de los sueros de caballos, gatos y perros

| | CABALLO | GATO | PERRO |
|-------------------------|----------------|-------------|--------------|
| Albolote | 0 | 38 | 59 |
| Alfacar | 0 | 0 | 4 |
| Alhendín | 0 | 1 | 8 |
| Almuñecar | 0 | 14 | 20 |
| Armillá | 0 | 3 | 3 |
| Atarfe | 0 | 10 | 4 |
| Baza | 0 | 6 | 3 |
| Cajar | 0 | 0 | 1 |
| Cenes de la Vega | 0 | 0 | 1 |
| Cullar- Vega | 0 | 8 | 13 |
| El Padul | 0 | 2 | 6 |
| FuenteVaqueros | 0 | 0 | 1 |
| Gojar | 0 | 0 | 1 |
| Granada | 8 | 63 | 61 |
| Guadix | 0 | 0 | 3 |
| Güejar Sierra | 1 | 0 | 0 |
| Huetor Santillán | 0 | 0 | 1 |
| Huetor Vega | 0 | 0 | 5 |
| Iznalloz | 0 | 0 | 1 |
| Lanjarón | 0 | 0 | 7 |
| Las Gabias | 0 | 21 | 19 |
| Lecrín | 0 | 1 | 1 |
| Loja | 0 | 2 | 6 |
| Maracena | 0 | 18 | 16 |
| Monachil | 3 | 0 | 3 |
| Moratalla | 1 | 0 | 0 |
| Motril | 0 | 7 | 3 |
| Otura | 0 | 8 | 0 |
| Peligros | 0 | 0 | 4 |
| Pinos Puente | 1 | 2 | 3 |
| Pulianas | 0 | 0 | 6 |
| Salobreña | 0 | 1 | 3 |
| Santa Fé | 0 | 2 | 3 |
| Sierra Nevada | 0 | 0 | 3 |
| Zubia | 0 | 6 | 14 |
| TOTAL | 14 | 213 | 286 |

En la **Figura IV.2** se muestra la distribución de los sueros recogidos del laboratorio ANLAVE por especie animal y área geográfica.

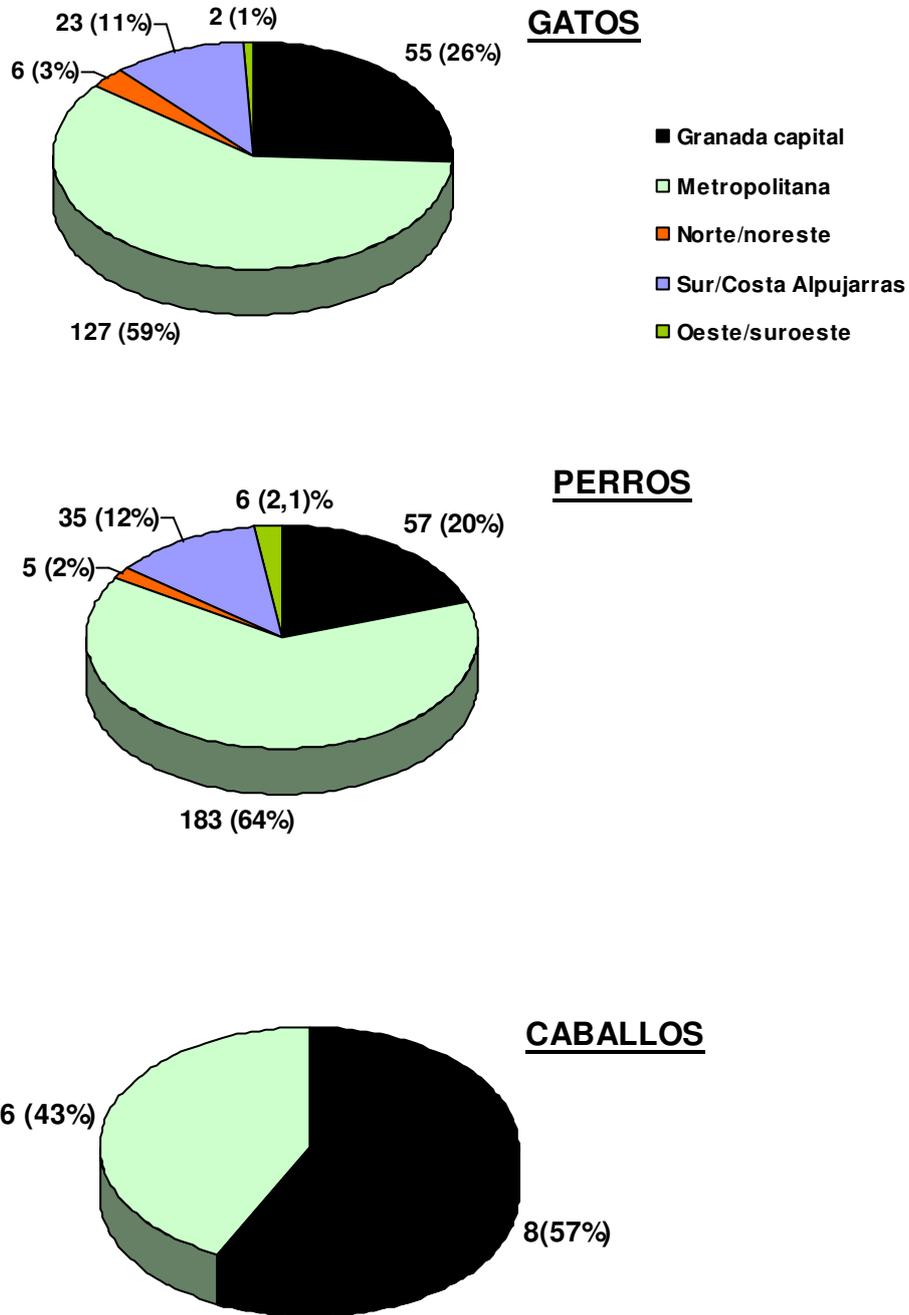


Figura IV.2. Distribución de los sueros de perros gatos y caballos por área geográfica

En el Laboratorio de Sanidad Animal de Santa Fe, se recogieron los 673 sueros restantes que correspondían a 243 (20,5%) cabras, 50 (4,2%) cerdos, 229 (19,3%) ovejas y 151 (12,7%) vacas. La procedencia de las mismas se describe en **Tabla IV.8**. Todas las muestras correspondían a lo que consideramos previamente área metropolitana de Granada.

Tabla IV.8. Poblaciones de procedencia de los sueros de cabras, cerdos, ovejas y vacas

| | CABRA | CERDO | OVEJA | VACA |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Alfacar | 31 | 0 | 30 | 0 |
| Atarfe | 25 | 0 | 0 | 0 |
| Beas | 19 | 0 | 0 | 0 |
| Cogollos-Vega | 62 | 0 | 74 | 35 |
| Dilar | 0 | 0 | 25 | 2 |
| Gabias | 25 | 0 | 25 | 0 |
| Güejar-Sierra | 0 | 0 | 0 | 75 |
| Huetor-Santillán | 28 | 0 | 25 | 0 |
| Huetor-Vega | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Monachil | 50 | 0 | 0 | 25 |
| Peligros | 0 | 0 | 25 | 0 |
| Pinos Puente | 0 | 50 | 25 | 0 |
| Viznar | 0 | 0 | 0 | 12 |
| Zubia | 0 | 0 | 0 | 2 |
| TOTAL | 243 | 50 | 229 | 151 |

IV.2.2. RESULTADOS DEL CULTIVO DE VTOS

En 256 de los 1186 sueros inoculados para cultivo, se detectaron alteraciones celulares sugerentes de infección viral de dichos cultivos. No obstante, ni en el sobrenadante de estos cultivos, ni en el de los cultivos sin efecto citopático (n=930), se pudo demostrar la presencia de VTOS mediante RT-PCR; por lo que consideramos de forma definitiva, que todos los cultivos de las muestras de suero de animales en línea celular Vero fueron negativos.

IV.2.3.RESULTADOS DE RT-PCR EN TIEMPO REAL FRENTE A VTOS

Se realizó RT-PCR en tiempo real específica frente a VTOS en las 1186 muestras de sueros congeladas previamente en buffer AVL. Inicialmente, fueron positivas 47 y negativas 1139. Los Cp de las muestras positivas oscilaron entre 35 y 40.

En la **Figura IV.3** se muestran los resultados positivos por especie animal en esta primera determinación.

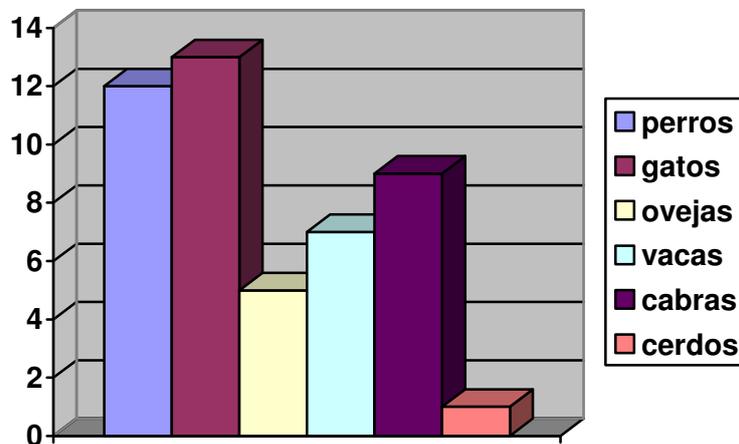


Figura IV.3. Distribución de resultados RT-PCR positivos por especie animal

Posteriormente, se repitió la PCR sobre el ADNc, ARN y, cuando hubo disponible, sobre la muestra de suero, de los resultados inicialmente positivos. Tras ello, sólo se pudo confirmar como positiva, la muestra de una cabra procedente de Alfacar, que volvió a amplificar VTOS a partir del ARN congelado y del ADNc (de dicho animal no quedó muestra de suero inicial para repetir la prueba). El Cp detectado en este ensayo fue de 35,5.

IV.2.4.RESULTADOS DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Del total de 1186 muestras de suero pertenecientes a todas las especies 429 (36,2%) fueron positivas para IFI a VTOS y 757 (63,8%) negativas.

La distribución de los resultados de IFI por especie animal se muestran en **Tabla IV.9**.

Tabla IV.9. Resultados de IFI por especie animal

| ANIMAL | IFI [n (%)*] | | Total (n) |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------|
| | Negativa | Positiva | |
| CABALLO | 5 (35,7) | 9 (64,3) | 14 |
| CABRA | 200 (82,3) | 43 (17,7) | 243 |
| CERDO | 39 (78) | 11 (22) | 50 |
| GATO | 86 (40,4) | 127 (59,6) | 213 |
| OVEJA | 155 (67,7) | 74 (32,3) | 229 |
| PERRO | 148 (51,7) | 138 (48,3) | 286 |
| VACA | 124 (82,1) | 27 (17,9) | 151 |
| Total | 757 (63,8) | 429 (36,2) | 1186 |

p< 0,001; * % del nº determinaciones/determinaciones totales por animal

La detección de anticuerpos frente a VTOS osciló entre 17,7%, obtenido en las cabras y el 64,3% de los caballos. Destaca el elevado porcentaje de positividad en gatos y perros con respecto a cabras, cerdos, ovejas y vacas. El análisis de residuos corregidos no dio significación estadística para los caballos, probablemente debido al escaso tamaño de la muestra.

La distribución de IFI positivas respecto a la especie animal (cabras ovejas y vacas) y localidad geográfica se muestran en las **Tablas IV.10 IV.11 y IV.12**. En los cerdos no se pudo realizar porque el 100% procedían de la misma localidad.

Tabla IV.10. Distribución de resultados de IFI según localidad geográfica en CABRAS

| | IFI negativa [n (%)] | IFI positiva [n (%)] | Total |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
| Alfacar | 19 (61,3) | 12 (38,7) | 31 (100) |
| Atarfe | 25 (100) | 0 | 25 (100) |
| Beas | 18 (94,7) | 1 (5,3) | 19 (100) |
| Cogollos | 44 (71) | 18 (29) | 62 (100) |
| Gabias | 22 (88) | 3 (12) | 25 (100) |
| Huetor-Santillán | 23 (82,1) | 5 (17,9) | 28 (100) |
| Huetor-Vega | 3 (100) | 0 | 3 (100) |
| Monachil | 46 (92) | 4 (8) | 50 (100) |
| Total | 200 (82,3) | 43 (17,7) | 243 (100) |

p<0,001

Tabla IV.11. Distribución de resultados de IFI según localidad geográfica en OVEJAS

| | IFI negativa [n (%)] | IFI positiva [n (%)] | Total |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
| Alfacar | 20 (66,7) | 10 (33,3) | 30 (100) |
| Cogollos | 54 (72,9) | 20 (27,1) | 74 (100) |
| Dilar | 19 (76) | 6 (24) | 25 (100) |
| Gabias | 15 (60) | 10 (40) | 25 (100) |
| Huetor-Santillán | 13 (52) | 12 (48) | 25 (100) |
| Peligros | 16 (64) | 9 (36) | 25 (100) |
| Pinos-Puente | 18 (72) | 7 (28) | 25 (100) |
| Total | 155 (67,7) | 74 (32,3) | 229 (100) |

p=0,342

Tabla IV.12. Distribución de resultados de IFI según localidad geográfica en VACAS

| | IFI negativa [n (%)] | IFI positiva [n (%)] | Total |
|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| Cogollos | 29 (82,9) | 6 (17,1) | 35 (100) |
| Dílar | 2 (100) | 0 | 2 (100) |
| Güejar Sierra | 61 (81,3) | 14 (18,7) | 75 (100) |
| Monachil | 20 (80) | 5 (20) | 25 (100) |
| Víznar | 11 (91,7) | 1 (8,3) | 12 (100) |
| Zubia | 1 (50) | 1 (50) | 2 (100) |
| Total | 124 (63,8) | 27 (17,9) | 151 (100) |

p=0,745

No se detectó ningún positivo en las cabras procedentes de Atarfe y Huétor-Vega. La distribución de resultados positivos y negativos en las ovejas fue bastante homogénea, independientemente de la localidad. En el caso de las vacas, analizando los resultados por localidades, exceptuando Dílar y la Zubia, en las que se estudiaron sólo dos animales en cada una, la seroprevalencia de VTOS fue bastante regular en el resto de municipios.

El análisis estadístico demostró únicamente diferencias significativas con las cabras, donde se vio que en la localidad de Alfacar la seroprevalencia fue superior que en el resto de poblaciones analizadas.

Los resultados de IFI en gatos y perros por área geográfica se muestran en las **Tablas IV.13 y IV.14**. Como la dispersión de la muestra fue muy grande para estos dos animales, se agruparon los resultados en las 5 áreas geográficas de la provincia de Granada, como se muestra en la **Figura IV.1**.

Tabla IV.13. Distribución de resultados de IFI según área geográfica en GATOS

| | IFI negativa [n (%)] | IFI positiva [n (%)] | Total |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|------------|
| Granada capital | 21 (38,2) | 34 (61,8) | 55 |
| Metropolitana | 55 (43,3) | 72 (56,7) | 127 |
| Sur/Costa/Alpujarras | 8 (34,8) | 15 (65,2) | 23 |
| Norte/Noreste | 1 (16,7) | 5 (83,3) | 6 |
| Oeste/Suroeste | 1 (50) | 1 (50) | 2 |
| Total | 86 (40,4) | 127 (59,6) | 213 |

p= 0,673

Tabla IV.1. Distribución de resultados de IFI según área geográfica en PERROS

| | IFI negativa [n (%)] | IFI positiva [n (%)] | Total |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|------------|
| Granada capital | 35 (61,4) | 22 (38,6) | 57 |
| Metropolitana | 88 (48,1) | 95 (51,9) | 183 |
| Sur/Costa/Alpujarras | 19 (54,3) | 16 (45,7) | 35 |
| Norte/Noreste | 3 (60) | 2 (40) | 5 |
| Oeste/Suroeste | 3 (50) | 3 (50) | 6 |
| Total | 148 (51,7) | 138 (48,3) | 286 |

p= 0,502

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de seroprevalencia frente a VTOS en gatos y perros, analizadas por área geográfica.

Finalmente, sólo se analizaron 14 caballos, 8 de ellos procedentes de Granada capital y 6 del área metropolitana, siendo positivos en 5 (62,5%) y 4 (66,7%) casos, respectivamente.

V. DISCUSIÓN

V.1. PATOLOGÍA NO NEUROLÓGICA VTOS

En la infección por VTOS, como en otras arbovirosis similares, el diagnóstico puede realizarse por aislamiento en cultivo del microorganismo, por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) o por técnicas serológicas.

En los procesos neurológicos, donde la muestra fundamental para el diagnóstico es el LCR en fase aguda, las TAAN han demostrado ser las que tienen mayor sensibilidad, con respecto al cultivo o la serología (Pérez Ruiz y cols., 2007).

Para el diagnóstico de procesos sin focalidad, como son los estudiados en el presente trabajo, y como sucede en otras arbovirosis similares, la detección de IgM específica en suero agudo o bien la evidencia de seroconversión o seroincremento de IgG entre sueros de fase aguda y convaleciente, son herramientas útiles.

Es importante que estas técnicas serológicas utilicen antígenos lo más específicos posibles del VTOS. La nucleoproteína de VTOS se caracteriza por su alto grado de inmunogenicidad y es el mayor antígeno responsable de las respuestas para ambas inmunoglobulinas IgG e IgM. El utilizar técnicas de ELISA presenta la ventaja de permitir el procesamiento rápido de un elevado número de muestras, lo que las convierte en ideales para estudios clínicos como el realizado en la presente tesis. Un inconveniente radicaría en la posibilidad de reacción cruzada con otros *Phlebovirus*. La utilización de un test inmunoenzimático en el que se utiliza nucleoproteína recombinante expresada en *Escherichia coli* como antígeno específico permite en gran parte excluir estas reacciones cruzadas (Valassina y cols., 2003).

La técnica de ELISA empleada en este estudio (Diesse, Italia) utiliza como antígeno específico nucleoproteína recombinante de VTOS y se ha revelado como sensible y específica para la detección de IgG e IgM frente a

VTOS y ha sido utilizada previamente en numerosos estudios de seroprevalencia (Sanbonmatsu y cols., 2005; de Ory y cols 2007), así como para el diagnóstico de infección aguda por VTOS (Echevarría y cols., 2003; Defuentes y cols., 2005, Ventura y cols., 2007b).

Como sucede en otras arbovirosis en las que especificidad virus /vector es alta, VTOS se ha detectado en muchos de los países del mediterráneo donde circulan los flebotomos que lo transmiten. Los datos epidemiológicos así lo confirman. En España las prevalencias más altas están relacionadas con la distribución de los flebotomos en las regiones mediterráneas: Granada, Barcelona, Jerez y Palma de Mallorca (Mendoza y cols., 1988). En Madrid la seroprevalencia informada por de Ory y colaboradores (2007) es inferior, oscilando entre el 7,2% en 1993-1994 y 5,7% en 1999-2000. Otros estudios en Italia, donde fue originalmente aislado VTOS en Grosseto (Verani y cols., 1980) muestran tasas similares, así Valassina y colaboradores (2003) observaron una prevalencia de anticuerpos anti-VTOS del 22,7% en la población del área urbana de Siena, que aumentaba al 77,2% en población expuesta profesionalmente. En el sur de Francia se encontró una tasa del 12% en donantes de sangre (De Lamballerie y cols., 2007); y en países del norte de Europa, como cabría esperar, estas tasas son más bajas (en Alemania menor del 1%), demostrando que la infección por VTOS se puede considerar endémica de países ribereños del Mediterráneo (Schwarz y cols., 1995a).

Estudios serológicos previos realizados en Granada mostraban tasas de seroprevalencia de VTOS en torno al 25%, que se incrementaban conforme aumentaba la edad de la población estudiada, de tal modo que la tasa de anticuerpos frente a VTOS pasaba de 9,4% en los menores de 15 años hasta 60,4% en los mayores de 65 años (Sanbonmatsu y cols., 2005). Nuestros datos son bastante similares en cuanto a la prevalencia global y a mostrar tendencia a aumentar con la edad, ya que hemos obtenido una prevalencia global del 20,4% y un menor porcentaje de positivos en la edad pediátrica, siendo del 4,8% en menores de 15 años y 18,9% en el grupo de 15-40 años de edad, que se incrementa al 32,6% y 34,6% en los grupos de 41 a 65 años y más de 65 años, respectivamente. No obstante, los porcentajes de prevalencia, por grupos

de edad difieren con los estudios previos, siendo como se ha descrito anteriormente, en general menores, probablemente debido a que nuestra población no se estratificó previamente con vistas a realizar un estudio epidemiológico, si no que la variable para seleccionar la población a estudiar ha sido el que presenten una patología presumiblemente infecciosa, no neurológica, en una determinada época del año, y por tanto las poblaciones de los diferentes grupos de edad pueden no ser homogéneas en cuanto al número, sexo, localización geográfica, etc.

Si bien no se dispone de información concreta sobre el tiempo de persistencia de los anticuerpos frente a VTOS, al igual que ocurre en otras infecciones virales, probablemente la presencia de IgG específica sea detectada de por vida. Además, como los estudios de prevalencia se han realizado en áreas endémicas, es posible que reinfecciones periódicas actúen como un efecto booster en la inmunidad (Magurano F y cols., 1999). De esta forma, el aumento de prevalencia edad-dependiente podría indicar un efecto cohorte relacionado con la exposición a VTOS a lo largo de la vida.

La mayor circulación de flebotomos en nuestro medio se produce en los meses cálidos (Morillas Márquez y cols., 1991), y sería en estos periodos, por tanto, cuando mayor riesgo de infección por *Phlebovirus* existe. Estudios anteriores han demostrado una alta incidencia de meningitis debidas a VTOS durante los meses de verano, con un pico en el mes de agosto, correspondiendo a la máxima actividad del vector. En Granada, en un estudio realizado en 2005, el 47% de los casos de infección neurológica por VTOS se dieron en el mes de agosto y el 66,5% entre julio y agosto (Sanbonmatsu, 2005, tesis doctoral).

Estos datos, junto con las elevadas tasas de seroprevalencia encontradas en algunas zonas, sugieren que una proporción de casos de infección por VTOS son asintomáticos o paucisintomáticos.

Por otro lado, distintos *Phlebovirus*, como VN o VS, se han asociado a procesos febriles, de intensidad moderada, sin afectación neurológica.

En este sentido, cabe la posibilidad de que VTOS pudiera ser causante de procesos similares u otros cuadros no neurológicos, que por su escasa gravedad no suelen requerir atención médica especializada y sí ser objeto de consulta en el ámbito extrahospitalario.

Nosotros en este estudio hemos seleccionado pacientes con este perfil incluyendo procesos febriles autolimitados, infección respiratoria aguda, exantemas y procesos que cursen con artralgias; durante los meses de mayor circulación del vector. Estos pacientes, que no son hospitalizados y padecen una enfermedad autolimitada, no suelen ser estudiados desde el punto de vista del diagnóstico etiológico por el laboratorio, lo cual puede contribuir, en su caso, a la subestimación de las tasas de infección por VTOS (Charrel y cols., 2005).

Se han descrito pocos casos de infección por VTOS sin patología neurológica: en el año 2002, Portolani y colaboradores describieron una serie de 9 sujetos, en el que uno de ellos se trataba de un eritema febril, sin manifestaciones meníngeas, y posteriormente se publicó un caso de enfermedad influenza-like (Hemmersbach-Miller y cols., 2004).

Nuestros datos, muestran que VTOS no parece estar asociado de forma clara a procesos no neurológicos. Durante el periodo de estudio, sólo se detectó un caso diagnosticado clínicamente de exantema no-febril en una paciente de 41 años, en la que el resultado de IgM anti-VTOS fue positivo y el resultado de IgG dio un resultado positivo débil. La enfermedad fue autolimitada y no tuvo afectación del SNC en ningún momento. Esta es la primera vez que se describe un cuadro no neurológico asociado a infección por VTOS en nuestro país.

No obstante, y en la misma época en la que se estaba realizando el estudio motivo de esta tesis, en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves”, se diagnosticaron 3 casos de infección del SNC por VTOS, datos no mostrados previamente por no ser objeto de la tesis,

pero que demuestran la circulación de VTOS durante el periodo de estudio, y asociado a la patología que le es más común: 2 de ellos fueron meningoencefalitis con complicaciones isquémicas y el tercero una meningitis de evolución benigna (Sanbonmatsu y cols., 2009).

En 1997, Braito y colaboradores realizaron un estudio serológico para demostrar la existencia de infecciones por VTOS sin manifestaciones del SNC, para ello estudiaron los contactos de casos “índice” de infección meníngea debida a VTOS de pacientes ingresados en los hospitales de Siena, y encontraron un 11% de resultados positivos de IgG y un 5,7% de positivos para IgG e IgM. En estos sujetos no se constató enfermedad en las cuatro semanas anteriores a la determinación serológica. Estos datos, junto con nuestros resultados, en los que no se detecta IgM anti-VTOS en sujetos con síndrome febril u otros procesos no graves, podrían ser indicativos de que la infección por VTOS básicamente cursa sin sintomatología y cuando ésta se manifiesta prácticamente siempre lo hace como procesos neurológicos de gravedad variable.

Las cepas de VTOS aisladas en España muestran diferencias significativas en la secuencia del fragmento L amplificado respecto a la cepa italiana de referencia ISS.Ph1.3, hasta tal punto que se han descrito 2 genotipos de VTOS: genotipo español e italiano (Sanbonmatsu y cols., 2005). Incluso se han demostrado diferentes variantes de la misma cepa, cocirculando en el mismo área y el mismo periodo de tiempo, en aislamientos ambientales y de pacientes en Italia (Venturi y cols., 2007a).

A pesar de las altas tasas de seroprevalencia que existen en nuestra zona, se describen menos casos de enfermedad severa que en otros países (Nicoletti y cols., 1991). Una posible explicación sería que el genotipo español VTOS fuera menos neurovirulento que el italiano. Se ha especulado, que cambios en partes del genoma, tales como las regiones no codificantes, afecten a la neurovirulencia del virus, tal y como se describe para encefalitis por mordedura de garrapatas (Sanbonmatsu y cols., 2005). Otra hipótesis sería que de las diferentes cepas de VTOS que circulan en la misma área e infectan

al hombre, sólo unas pocas puedan producir enfermedad severa, mientras que la mayor parte de las mismas induzcan respuesta de anticuerpos, con pocos o ningún síntoma de enfermedad (Magurano y cols., 1999).

Las proteínas no estructurales son las más variables entre los *Phlebovirus* y juegan un papel muy específico en cada virus. Por otra parte, estudios preliminares realizado con proteínas estructurales, han demostrado una protección parcial de los anticuerpos anti-N, *in vitro* e *in vivo*, pero, no está claro el papel de los anticuerpos anti-G₁ y anti-G₂; para ello se están realizando ensayos en orden a determinar el papel exacto de la respuesta celular en la protección de pacientes sintomáticos y asintomáticos (Valassina y cols., 2003).

En nuestro estudio se han analizado 358 muestras de suero, la mayor parte procedían de pacientes con síndrome febril banal (299), de las que en ninguno de ellos logramos detectar la presencia de IgM, indicativa de infección reciente. Sin embargo, entre los 4 casos de exantema que estudiamos, encontramos una IgM anti-VTOS positiva, y como se ha comentado anteriormente Portolani y colaboradores (2002) ya describieron un paciente con eritema febril asociado a infección por VTOS. Por otro lado, Di Nicuolo y colaboradores (2005) también refieren rash en 2 pacientes, pero esta vez asociados a un proceso neurológico. Estas coincidencias, podrían llevar a plantearnos la posibilidad de que, aparte de en procesos neurológicos, VTOS pudiera también estar implicado, aunque en menor grado, en procesos exantemáticos o eritematosos durante el periodo estival. Por tanto, cabría plantearse, incluir su estudio ante cuadros de este tipo, sobre todo si existe el antecedente de picadura del posible vector; tal y como actualmente se realiza para el diagnóstico de fiebre botonosa por *Rickettsia .conorii* tras picaduras, muchas veces no bien filiadas.

V.2. ESTUDIO DE VTOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

VTOS se ha aislado de *P.perniciosus* y *P.perfliewi* en Italia y desde hace poco de *S.minuta* en Francia (Charrel y cols., 2006), pero en España sólo se ha conseguido aislar de *P.perniciosus* (Sanbonmatsu y cols., 2005), que con toda probabilidad es su principal, sino único vector, ya que *P.perfliewi* no se ha aislado en España y *S.minuta* que sí que existe en nuestro país, se trata de un especie herpetófila que sólo pica a los reptiles. Se han descrito 2 linajes de *P.perniciosus*, el típico que se encuentra en Marruecos, Túnez, Malta, Sicilia e Italia y el linaje ibérico. Éstos permanecen aislados entre sí, debido a que los flebotomos se mueven en saltos cortos, y no vuelan más de pocos cientos de metros de sus lugares de descanso (Pesson y cols., 2004). Las divergencias entre los 2 genotipos reconocidos de VTOS podrían, por tanto, ser explicadas parcialmente por las características de sus respectivos vectores.

Con respecto a posibles reservorios, no se han reconocido ni mamíferos ni aves como potenciales reservorios, si bien se han realizado pocos estudios sobre mamíferos y ninguno sobre aves. Es posible, que el hombre juegue un papel en el ciclo biológico del virus al picar flebotomos no infectados a personas con viremia por VTOS. No está claro el papel de los vertebrados en la transmisión del ciclo biológico de otros *Phlebovirus* si bien se han aislado de sangre de personas enfermas y animales salvajes, sobre todo en virus relacionados con VTOS en el continente americano (Seymour y cols., 1983). Viremias transitorias y de bajo nivel están presentes tras infecciones por *Phlebovirus* en humanos y animales susceptibles de laboratorio (Bartelloni y cols., 1976; Cusi y cols., 2005). No obstante, los flebotomos deben ingerir grandes cantidades de virus para infectarse (Ciufolini y cols., 1985). Ello, lleva a pensar a algunos autores que el reservorio más fácil de VTOS pueda ser el propio vector (Charrel y cols., 2005; Venturi y cols., 2007a).

Verani y colaboradores (1988) examinaron diferentes especies de vertebrados salvajes (ratones de campo, topos, martas, castores, puercoespines, murciélagos, zorros y erizos) y ovejas con tests serológicos y aislamiento viral; los datos serológicos no mostraron evidencia de infección

entre los animales salvajes, pero sí en las ovejas y en un ratón de campo. Sin embargo, se aisló una cepa de VTOS del cerebro de un murciélago.

Nuestro estudio lo hemos realizado exclusivamente sobre animales domésticos, de aquellas zonas donde previamente se había detectado VTOS en flebotomos.

En el estudio de seroprevalencia realizado en estos mamíferos hemos encontrado altas tasas de positividad (desde el 17,7%, en las cabras hasta el 64,3% de los caballos), lo que demuestra el contacto previo de VTOS con todos ellos. Hay que destacar el elevado porcentaje de positividad en gatos y perros con respecto a cabras, cerdos, ovejas y vacas. Puede ser que, los hábitos y preferencias alimenticias de *P.perniciosus* sean los responsables de estos resultados. Estudios previos demostraron que con algunas salvedades, nunca pican a los pollos, y sí frecuentemente a las ovejas en sitios donde hay ovejas y cabras. También exhiben especial predilección por los perros (Colmenares y cols., 1995). En nuestra casuística, los perros y gatos obtuvieron las mayores tasas con resultados de 48,3% y 59,6% respectivamente. Las ovejas tuvieron un índice de seropositividad del 32,3% bastante superior al de las cabras, que fue del 17,7%, lo que estaría de acuerdo con lo comentado anteriormente. Otro estudio, determinó que tanto *P.perniciosus* como *P.perfiliewi* se alimentaban sobre perros, equinos, ovejas y aves además del hombre, y defendían que la preferencia alimenticia dependía más de la disponibilidad que del potencial atractivo de cada una de las especies animales (Bongiorno y cols., 2003). De hecho, este puede ser el caso de perros y gatos, en sitios donde no tienen acceso a otros vertebrados, como ocurre con los que viven en zonas urbanas.

Al analizar los resultados de las tasas de positividad de los distintos animales estudiados con respecto a la procedencia geográfica de los mismos, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las cabras de la población de Alfacar con mayor índice de positividad que las determinadas en otras localizaciones geográficas de la provincia de Granada. Este dato concuerda con los estudios realizados previamente (Sanbonmatsu, 2005, tesis

doctoral) en pools de flebotomos capturados en distintas zonas de nuestra provincia y, en donde VTOS sólo fue detectado por RT-PCR en las localidades de Alfacar y Víznar. Además, entre los pacientes con infección del SNC, estudiados dentro del subproyecto Toscana de la Red EVITAR (años 2005-2006), se detectaron 3 casos de meningitis por VTOS. Un caso procedía de Moraleda de Zafayona, y debutó como una encefalitis persistente con complicaciones isquémicas. Y los dos casos restantes fueron dos meningitis banales en pacientes que residían en Jun y Víznar, poblaciones lindantes con Alfacar (comunicación personal Dr. Navarro, Servicio de Microbiología Hospital Virgen de las Nieves de Granada). Estos tres casos se diagnosticaron por RT-PCR y aislamiento en línea celular Vero.

En nuestro estudio, sobre 1186 muestras de suero de animales domésticos cultivadas en células Vero y posterior RT-PCR en los sobrenadantes no encontramos ningún resultado positivo para VTOS.

La RT-PCR realizada directamente de las muestras de suero fue positiva en 47 de las mismas, si bien al realizar la repetición sobre ADNc y ARN sólo se pudo confirmar el resultado en una cabra, aunque no conseguimos amplificado suficiente para secuenciar el fragmento de PCR y confirmar la secuencia específica de VTOS. La RT-PCR en tiempo real que utilizamos es específica de VTOS y no da reacción inespecífica con otros virus ARN e incluso con otros *Phlebovirus*; (Pérez-Ruiz y cols., 2007); no obstante, habría sido de mucha ayuda obtener material genético suficiente para estudio del genoma del virus detectado en esta especie animal y así poder establecer el grado de homología con las cepas de VTOS aisladas previamente en nuestro medio en humanos y flebotomos.

Es posible que el motivo sea la baja viremia que hace poco sensible esta técnica o que el virus pueda acantonarse en otros órganos tras la viremia inicial, siendo imposible detectarlo en suero. De hecho, el único VTOS aislado hasta la fecha en vertebrados (no humanos) fue en el cerebro de un murciélago, no recuperándose de otros órganos ni de sangre (Verani y cols., 1988).

En cuanto a la detección de VTOS en una cabra, se trata de la primera vez en la que se detecta este virus en sangre de un vertebrado no humano; y lo que consideramos aún más interesante, este resultado se produjo en una muestra de sangre extraída en el mes de enero, fuera de los meses cálidos en los que circulan los vectores. La importancia de este hallazgo está por determinar. Ya que este hecho, si bien no confirma en si mismo, que la cabra sea el reservorio natural de VTOS, si que plantea al menos, la posibilidad de que algunos mamíferos vertebrados domésticos puedan efectivamente actuar como reservorio de VTOS para continuar su ciclo biológico durante todo el año; ciclo, en el que el hombre sería un huésped accidental, que ocasionalmente puede enfermar, a veces con cuadros neurológicos graves.

Tras lo expuesto consideramos que hay suficientes razones que justifican el que deban realizarse más estudios en el futuro en este sentido, para un mejor conocimiento de la que es sin duda la principal arbovirosis que afecta a humanos en nuestro medio.

VI. CONCLUSIONES

1. La seroprevalencia por virus Toscana en la población general en nuestro medio es alta (20,4%) y aumenta con la edad.

2. Virus Toscana es un patógeno poco frecuente en procesos no neurológicos. No se ha detectado VTOS ni en síndromes febriles, ni en infecciones respiratorias agudas sin filiar.

3. Se describe por primera vez en España un caso de infección no neurológica por virus Toscana; se trató de un exantema no febril.

4. La seroprevalencia frente a virus Toscana es alta en animales domésticos en nuestra zona (desde 17,7% en cabras hasta 64,3% en caballos).

5. Las tasas de seroprevalencia frente a virus Toscana en los animales estudiados (caballos, cabras, cerdos, gatos, ovejas, perros y vacas), no muestran diferencias cuando se analizan las distintas zonas de la provincia, con la excepción de las cabras procedentes de Alfacar, en las que la tasa es significativamente superior.

6. Se detecta virus Toscana mediante RT-PCR en el suero de una cabra, del municipio de Alfacar, extraído en el mes de enero. Es la primera vez, a nivel mundial, que se detecta virus Toscana en sangre de un vertebrado no humano.

VII. BIBLIOGRAFÍA

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: 119-131.

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.

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

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.

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

Bernabeu-Wittel M, Ruiz-Pérez M, del Toro MD, Aznar J, Muniain A, de Ory F, Domingo C, Pachón J. West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 561-565.

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: 62-67.

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

Braitto A, Ciufolini MG, Pippi L, Corbisiero R, Fiorentini C, Gistri A, Toscano L. Phlebotomus-transmitted Toscana virus infection of the central nervous system: a seven-year experience in Tuscany. *Scand J Infect Dis* 1998a; 30: 505-508.

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* 1998b; 132: 144-148.

Braitto A, Corbisiero R, Corradini S, Marchi B, Sancasciani N, Fiorentini C, y cols. Evidence of Toscana virus infections without central nervous system involvement: a serological study. *Eur J Epidemiol* 1997; 13: 761-764.

Brès P. Impact of arboviruses on human and animal health. En: Monath TP, editor. *The arboviruses: Epidemiology and Ecology*. Fort Collins, 1986:1-18.

Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. 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.

Charrel RN. Toscana virus: emergence in Southern Europe. XVIII European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelona, 2008. [Abstract S201]

Charrel RN, Izri A, Temmam S, de Lamballerie X, Parola P. Toscana Virus RNA in *Sergentomyia minuta* Flies. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12: 1299-1300.

Charrell RN, Gallian P, Navarro-Marí JM, Nicoletti L, Papa A, Sanchez-Seco MP, Tenorio A, De Lamballerie X. Emergente of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis* 2005, 11 : 1657-1663.

Charrel RN, Izri A, Temmam S, Delaunay P, Toga I, Dumon H, Marty P, De Lamballerie X, Parola P. Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, Southeastern France. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 465-468.

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: 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: 229-233.

Connell J, McKeown P, Garvey P, Coster S, Conway A, O'Flanagan D, et al. Two linked cases of West Nile virus infections in France. *Eurosurveillance Weekly* 8, 2004. URL disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2004/040805.asp>.

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.

De Lamballerie X, Tolou H, Durand JP, Charrel RN. Prevalence of Toscana virus antibodies in volunteer blood donors and patients with central nervous system infections in southeastern France. *Vector Borne and Zoonotic Dis.* 2007; 17:275-277.

De Ory-Manchón F, Sanz-Moreno JC, Aranguren-Ruiz E, Ramírez-Fernández R. Seroprevalencia edad dependiente frente al virus Toscana en la Comunidad

de Madrid: años 1993-1994 y 1999-2000. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 187-189.

Defuentes G, Rapp C, Imbert P, Durand JP, Debord T. Acute meningitis owing to *Phlebotomus fever Toscana virus* imported to France. *J TravelMed* 2005;12:295-296.

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.

Di Nicuolo G, Pagliano P, Battisti S, Starace M, Mininni V, Attanasio V, Faella FS. *Toscana Virus* Central Nervous System Infections in Southern Italy. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 6186-6188.

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: 435-438.

D` Ovidio MC, Venturi G, Fiorentini C, Barbati G, Di Renzi S, Vonesch N, Ciufolini MG, Tomao P. Occupational risk associated with Toscana virus infection in Tuscany, Italy. Occup Med (Lond) 2008; 58:540-544.

Echevarría 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 1991a; 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: 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.

Figuerola J, Soriguer R, Rojo G, Gomez Tejedor C, Jimenez-Clavero MA,. Seroconversion in Wild Birds and Local Circulation of West Nile Virus, Spain. Emerg Infect Dis. 2007;13:1915-1917.

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.

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.

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

Kaptoul D, Viladrich PF, Domingo C, Niubó J, Martnez-Yélamos S, De Ory F et al. West Nile virus in Spain: report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis. *Scand J Infect Dis*. 2007; 39:70-71.

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.

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: 55-60.

Mailles A, Dellamonica P, Zeller H, Durand JP, Zientara S, Gofette R et al. Human and equine West Nile virus infections in France. *Eurosurveillance Weekly* 7 2003. URL disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2003/031023.asp>.

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: 283-286.

Martinez-Garcia FA, Moreno-Docon A, Lopez-Lopez M, Albert-Bacal L, Martinez-Toldos MC, Segovia-Hernandez M, Fernandez-Barreiro A. Un caso de meningitis por virus Toscana en Murcia. Rev Neurol 2007; 45 : 317-318.

Martinez-Garcia FA, Moreno-Docon A, Segovia-Hernández M, Fernández-Barreiro A. Sordera como secuela de meningitis por Virus Toscana. Med Clin (Barc) 2008;130:638-639.

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: 434-436.

Morales MA, Fabbri C, Enría D. Generalidades sobre Arbovirus y Arbovirosis.. En: Cecchini E, Gonzalez S (ed). Libro De Infectologia y Enfermedades infecciosas. Buenos Aires: Journal Ed, 2008; p.635-637.

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-Roldán C, Pérez-Ruiz M, Sanbonmatsu S, de la Rosa M, Sánchez-Seco MP. Meningitis por virus Toscana en España: descripción clínica de 17 casos. Med Clin (Barc) 2004; 122: 420-422.

Nichol 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. p: 1603-1633.

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: 429-434.

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.

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

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.

Pérez Ruiz M, Collao X, Navarro-Marí JM, Tenorio A. Reversetranscription real-time PCR assay for detection of Toscana virus. *J Clin Virol* 2007; 39: 276-281.

Pesson B, Ready JS, Benabdennbi I, Essephir S, Martín Sánchez J, Cadi Soussi M, Morillas Márquez F, Ready P. Evidence of mitochondrial introgression and cryptic speciation involving *P. perniciosus* and *P. longicuspis* from the Moroccan Rift. *Med Vet Entomol* 2004; 18: 25-37.

Peyrefitte CN, Devetakov I, Pastorino B, Villeneuve L, Bessaud M, Stolidi P . Toscana Virus and acute meningitis, France. *Emerg Infect Dis*, 2005; 11: 778-780.

Portolani M, Sabbatini AM, Beretti F, Gennari W, Tamassia MG, Pecorari M. Symptomatic infections by toscana virus in the Modena province in the triennium 1999-2001. *New Microbiol* 2002; 25:485-488.

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: 693-698.

Reinert JF, Harbach RE, 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. Emergente of a new epidemia/epizootic Venezuelan equine encephalitis virus in South America. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5278-5281.

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, (eds). 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.

Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, Collao X, Sanchez-Seco MP, Morillas-Márquez F, de la Rosa Fraile M, Navarro-Marí JM, Tenorio A. Virus Toscana in Spain. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1701-1707.

Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, Palop-Borrás B, Navarro-Marí JM. Unusual manifestation of Toscana virus infection. . Emerg Infect Dis 2009; 15: 347-348.

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, Navarro JM . Infecciones por el virus de Toscana, el virus del Nilo occidental y otros arbovirus de interés en Europa. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23: 560-568.

Santos L, Simoes J, Costa R, Martins S, Lecour H. Toscana virus meningitis in Portugal , 2002-2005. Eurosurveillance Apr-Jun 2007;12: 126-128.

Savellini,G, Di Genova G, Terrosi Ch, Di Bonito P, Giorgi C, Valentini M, Doquier J-D, Cusi G. Immunization with Toscana virus bN-Gc proteins protects mice against virus challenge. Virology 2008; 375: 521-528.

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. p: 1581-1602.

Schwarz TF, Gilch S, Pauli C, Jäger G. Immunoblot detection of antibodies to Toscana virus. *J Med Virol* 1996; 49: 83-86.

Schwarz TF, Jäger S, Gilch S, Pauli C. Serosurvey and laboratory diagnosis of imported sandfly fever virus, serotype Toscana, infection in Germany. *Epidemiol Infect* 1995a; 114: 501-510.

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* 1995b; 146: 355-362.

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

Seymour C, Peralta PH, Montgomery G. Viruses isolated from panamanian sloths. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 1435-1444.

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: 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: 6-9.

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

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: 1310-1316.

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

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: 574-581.

Tesh RB, Modi GB. Maintenance of Toscana virus in *Phlebotomus perniciosus* by vertical transmission. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36: 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: 663-674.

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: 1164-1171.

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

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: 2103-2104.

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* 2003b; 10: 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: 201-205.

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: 2500-2502.

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.* New York San Diego: Academic Press 2000.

Venturi G, Ciccozzi M, Montieri S, Bartoloni A, Francisci D, Nicoletti L, Fortuna C, Marongiu L, Rezza G, Ciufolini G. Genetic variability of the M genome segment of clinical and environmental Toscana virus strains. *J Gen Virol* 2007a, 88 :1288-1294.

Venturi G, Madeddu G, Rezza G, Ciccozzi M, Pertinato ML, Ciliano M, Fiorentini C, mura MS, Ciufolini MG. Detection of Toscana virus central nervous system infections in Sardinia Island, Italy. *J Clin Virol* 2007b, 40 : 90-91.

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: 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: Vesenjok-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, 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: 433-439.

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: 611-616.

Weidmann M, Sanchez-Seco MP, Sall AA, Ogo Ly P, Thiongane Y, Lô MM, Schley H, Hufert Ft. Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *J Clin Virol* 2008 41:138-142.

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

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

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

