

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



TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIÓN DE UN NUEVO FLEBOVIRUS,
VIRUS GRANADA, EN PATOLOGÍA HUMANA.
ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO**

Cristina Gómez Camarasa

Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Cristina Gómez Camarasa
D.L.: GR 1357-2014
ISBN: 978-84-9083-000-0

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**, Catedrática del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral que presenta la Licenciada **Cristina Gómez Camarasa** “**IMPLICACIÓN DE UN NUEVO FLEBOVIRUS, VIRUS GRANADA, EN PATOLOGÍA HUMANA. ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO**” ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, 10 de Febrero de 2014.

Fdo: José María Navarro Marí

Fdo: María Jiménez Valera

La doctoranda **Cristina Gómez Camarasa** y los directores de la tesis **Dr. José María Navarro Marí** y **Dra. María Jiménez Valera**, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 10 de Febrero de 2014

Director/es de la Tesis

Doctoranda

Fdo.:

Fdo.:

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN	1
I.1. ARBOVIRUS.....	3
I.2. FAMILIA <i>BUNYAVIRIDAE</i>	8
I.2.1. ESTRUCTURA VÍRICA	9
I.2.1.1. MORFOLOGÍA.....	9
I.2.1.2. ORGANIZACIÓN GENÉTICA.....	10
I.2.1.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	11
I.2.2. TAXONOMÍA.....	11
I.2.3. CICLO VITAL	13
I.3. GÉNERO <i>PHLEBOVIRUS</i>.....	14
I.3.1. EL VECTOR	14
I.3.2. CLASIFICACIÓN DE LOS <i>PHLEBOVIRUS</i>.....	15
I.3.2.1. VIRUS DEL GRUPO “FIEBRE DE LOS FLEBOTOMOS”	16
I.3.2.1.1. VIRUS UUKUNIEMI.....	23
I.3.2.1.2 VIRUS NO ASIGNADOS	23
I.4. VIRUS GRANADA.....	24
I.4.1. ANTECEDENTES DE INFECCIÓN POR FLEBOVIRUS EN ESPAÑA	24
I.4.2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA	27
II. OBJETIVOS.....	29
III. MATERIAL Y MÉTODOS	37
III.1. ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA.....	35
III.1.1. DISEÑO.....	35
III.1.2. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y PERIODO DE ESTUDIO	35
III.1.3. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS IgG FRENTE A VIRUS GRANADA	36
III.1.4. NEUTRALIZACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO (ECP)	37
III.2. ESTUDIO CLÍNICO	37

III.2.1. DISEÑO.....	37
III.2.2. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y PERIODO DE ESTUDIO	37
III.2.3. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS IgM FRENTE A VIRUS GRANADA	39
III.2.4. DETECCIÓN DE IgM FRENTE VTOS.....	39
III.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	40
III.3.1. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	40
III.3.2. NEUTRALIZACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO	42
III.4. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS.....	43
III.4.1. PARA EL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO	43
III.4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
III.5. ANEXOS	45
III.5.1. ENCUESTA CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA.....	45
III.5.2. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	47
III.5.3. CÁLCULO DE LA DOSIS INFECTIVA 50% DE UN VIRUS TRAS CRECIMIENTO EN CULTIVO CELULAR (TCID ₅₀) (MÉTODO DE REED Y MUENCH).....	51
IV. RESULTADOS	53
IV.1. ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS GRANADA EN LA PROVINCIA DE GRANADA.....	55
IV.1.1. SEROPREVALENCIA DE INFECCIÓN POR VIRUS GRANADA, UTILIZANDO INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	55
IV.1.2. SEROPREVALENCIA DE INFECCIÓN POR VIRUS GRANADA, RESULTADOS OBTENIDOS UTILIZANDO SERONEUTRALIZACIÓN.	64
IV.2. ESTUDIO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS GRANADA EN LA PROVINCIA DE GRANADA.....	65
V. DISCUSIÓN	75
V.1. ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS GRANADA EN LA PROVINCIA DE GRANADA.....	77
V.1.1. ANÁLISIS GLOBAL.....	77

V.1.2. SEROPREVALENCIA DE VIRUS GRANADA ATENDIENDO A LA EDAD.....	79
V.1.3. SEROPREVALENCIA DE VIRUS GRANADA ATENDIENDO A LAS DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS DE LA PROVINCIA DE GRANADA	80
V.2. ESTUDIO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS GRANADA EN LA PROVINCIA DE GRANADA.....	81
VI. CONCLUSIONES.....	87
VII. BIBLIOGRAFÍA	91

ABREVIATURAS

ADSV	Virus Arboledas
AGUV	Virus Aguacate
ALEV	Virus Alenquer
AMTV	Virus Arumowot
ANHV	Virus Anhanga
ARBV	Virus Arbia
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_m	ARN mensajero
ARN_v	ARN viral
BELTV	Virus Belterra
BUEV	Virus Buenaventura
CACV	Virus Cacap
CAIV	Virus Caimito
CDUV	Virus Candiru
CFUV	Virus Courfou
CHGV	Virus Chagres
CHIV	Virus Chilibre
ECP	Efecto citopático
EIA	Enzimoimmunoanálisis
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ("Enzyme-Linked-Immunosorbent-assay")
EVITAR	Red de Enfermedades Víricas Transmitidas por Artrópodos y Roedores
FH	Fiebre hemorrágica
FHCC	Virus de la Fiebre hemorrágica Congo Crimea
FITC	Isotiocianato Fluoresceína
GFV	Virus Gabek Forest
GORV	Virus Gordil
IB	Inmunoblot
ICOV	Virus Icoaraci
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses

IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulina
IH	Inhibición de la hemaglutinación
IRA	Infección respiratoria aguda
ITAV	Virus Itaituva
ITPV	Virus Itaporanga
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MEM	Medio esencial mínimo
MUNV	Virus Munguba
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
NIQV	Virus Nique
NS	No estructurales
ODRV	Virus Odrenisrou
ORXV	Virus Oriximina
PACV	Virus Pacui
PBS	Tampón fostato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”)
PTV	Virus Punta Toro
RF	Factor reumatoide
RFC	Reacción de fijación de complemento
RGV	Virus Río Grande
RT-PCR	Reversotranscripción + PCR
RVFV	Virus de la Fiebre del Valle del Rift
SAFV	Virus Saint Floris
SALV	Virus Salehabad
SDRA	Síndrome Distrés Respiratorio Agudo
SF	Síndrome febril
SFB	Suero fetal bovino
SFSV	Virus Sicilia
SFTS	Síndrome de trombocitopenia con fiebre severa

SFVN	Virus Nápoles
SNA	Ensayo de seroneutralización
SS	Solución salina fisiológica
TCID	Dosis infectiva cultivo celular (“tissue culture infective dose”)
TCID₅₀	Dosis de virus que infecta al 50% de los cultivos celulares en que se inocula
TEHV	Virus Tehran
TUAV	Virus Turuna
URUV	Virus Urucuri
VGR	Virus Granada
VTOS	Virus Toscana
VWN	Virus West Nile

I.INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ARBOVIRUS

Los arbovirus son un grupo heterogéneo de virus, más de 500 virus, pertenecientes a distintas familias y géneros con la característica común de ser transmitidos por artrópodos. La palabra arbovirus deriva de la descripción de este grupo en inglés “ARthropod BOrne Viruses” (virus transmitidos por artrópodos). (Domínguez y cols, 2003).

El Catálogo Internacional de Arbovirus (Karabatsos y cols, 1985) incluye también ciertos virus zoonóticos, relacionados taxonómicamente, como *Hantavirus*, que se transmiten directamente de los animales al hombre sin la participación del vector. (Hollidge y cols, 2010; Walter y Barr, 2011).

La mayoría de ellos pertenecen a las familias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Bunyaviridae*. Todos ellos son virus ARN. (Hollidge y cols, 2010).

Los flebovirus son arbovirus generalmente transmitidos por flebotomos que pertenecen al género *Phlebotomus*, dentro de la familia *Bunyaviridae*. (Fauquet y cols, 2005).

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 vertebrado el virus se multiplica y ha de producir una viremia de título y duración suficiente para permitir que el ciclo se cierre cuando un nuevo artrópodo hematófago le pique y se alimente con su sangre infectada.

La infección vírica en los vertebrados suele ser aguda y autolimitada, mientras que los artrópodos permanecen infectados de por vida. Por otro lado se ha descrito la transmisión transovárica y sexual en artrópodos para algunos

de estos virus como Rio Grande (Endris y cols, 1983), virus de la Fiebre del Valle del Rift (RVFV) (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).

De los más de 500 arbovirus descritos, aproximadamente 150 han demostrado ser causa de enfermedad en humanos. (Domínguez y cols, 2003). Lo más frecuente es que la infección en humanos se produzca de forma casual, cuando un vector pica accidentalmente al hombre para alimentarse en vez de a su hospedador 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 hospedador 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. (Alkan y cols, 2013).

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, otros 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. (Hollidge y cols, 2010).

La incidencia de estas infecciones tiende a presentar un patrón estacional, siendo mayor durante la estación veraniega en las regiones templadas y en las lluviosas en los trópicos, debido a la mayor actividad de los vectores durante estas estaciones.

La mayoría de las infecciones por arbovirus son asintomáticas. El cuadro clínico, cuando se manifiesta, puede ser muy variado; desde un síndrome febril autolimitado, indistinguible clínicamente de otras infecciones víricas comunes, ocasionalmente exantemático, hasta graves cuadros neurológicos o fiebres hemorrágicas, que pueden ser mortales. (Soldan y González-Scarano, 2005). 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* (virus de la Fiebre del Valle del Rift (RVFV)) (Nichol, 2001).

- Asociados a cuadros neurológicos: *Flavivirus* (Encefalitis de San Luis, Encefalitis Japonesa, West Nile, Encefalitis transmitidas por garrapatas) (Burke y Monath, 2001); *Alphavirus* (Encefalitis Equina del Este y del Oeste) (Griffin, 2001); *Bunyavirus* (La Crosse) y *Phlebovirus* como virus Toscana (VTOS) y RVFV (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	Hospedador	Clínica^a	Distr. geográfica^b
Togaviridae / Alphavirus				
Chikungunya	Mosquitos	Humanos, primates	SF, A	Af, As
Ross River	Mosquitos	Humanos, marsupiales	SF, A	O
Mayaro	Mosquitos	Aves	SF	Sur Am
O'nyong-nyong	Mosquitos	¿?	SF	Af
Sinbis	Mosquitos	Aves	SF	As, Af, O, E, Am
Barmah Forest	Mosquitos	¿?	SF, A	O
Encefalitis equina del Este	Mosquitos	Aves	SF, ME	Am
Encefalitis equina del Oeste	Mosquitos	Aves, conejos	SF, ME	Am
Encefalitis equina Venezolana	Mosquitos	Roedores	SF, ME	Am
Flaviviridae /Flavivirus				
Dengue 1-4	Mosquitos	Humanos, primates	SF, HF	Trópicos
Fiebre amarilla	Mosquitos	Humanos, primates	SF, HF	Af, Sur Am
Encefalitis Japonesa	Mosquitos	Aves, cerdos	SF, ME	As, Pacífico
Encefalitis del valle Murray	Mosquitos	Aves	SF, ME	Australia
Rocío	Mosquitos	Aves	SF, ME	Sur Am
Encefalitis de San Luis	Mosquitos	Aves	SF, ME	Am
West Nile	Mosquitos	Aves	SF, ME	Af, E, Norte Am
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 Am
Bunyaviridae /Phlebovirus				
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
Bunyaviridae /Bunyavirus				
Encefalitis de La Crosse	Mosquitos	Roedores	SF, ME	Norte Am
Encefalitis de California	Mosquitos	Roedores	SF, ME	Norte Am, E, As
Oropouche	Jejenes	¿?	SF	Am
Bunyaviridae /Nairovirus				
Fiebre hemorrágica de Congo-Crimea	Garrapatas	Roedores	SF, FH	E, As, Af

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

^bAm= 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; Elliott 2009; Gould y Higgs, 2009; Walter y Barr, 2011). 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), virus West Nile (Hubalek y Halouzka, 1999; Giladi y cols, 2001; Marfin y Gubler, 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 (SFVN), virus Sicilia (SFSV) y VTOS en países ribereños del Mediterráneo. No obstante, cada vez se comunican con más frecuencia casos esporádicos de encefalitis por virus West Nile (VWN), y existe gran preocupación por la introducción de arbovirosis propias de otras latitudes como virus Chikungunya, Sinbis o Virus de la Fiebre del Valle del Rift (RVFV).

I.2. FAMILIA *BUNYAVIRIDAE*

En la última clasificación taxonómica de virus, en su informe del “International Committee on Taxonomy of Viruses” (ICTV), la familia *Bunyaviridae* comprende unos 768 virus distribuidos en cinco géneros: *Orthobunyavirus* (112), *Hantavirus* (452), *Nairovirus* (31), *Phlebovirus* (106) y *Tospovirus* (44), además existe un grupo sin clasificar de 23 virus. (NCBI Taxonomy, 2012 (<http://ecat-dev.gbif.org>)).

Todos ellos tienen unas características estructurales comunes: envuelta lipídica con espículas glicoproteicas, genoma ARN tri-segmentado (segmentos S, M y L), casi siempre de polaridad negativa y el patrón de codificación de proteínas bastante parecido (Nichol, 2001; Elliott, 2009; Walter y Barr, 2011).

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

Los virus de esta familia en general dependen de animales como hospedadores para persistir en la naturaleza ya que normalmente no ocurre la transmisión humano-humano, siendo el hombre un hospedador 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 hospedadores 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) 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.1**).

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).

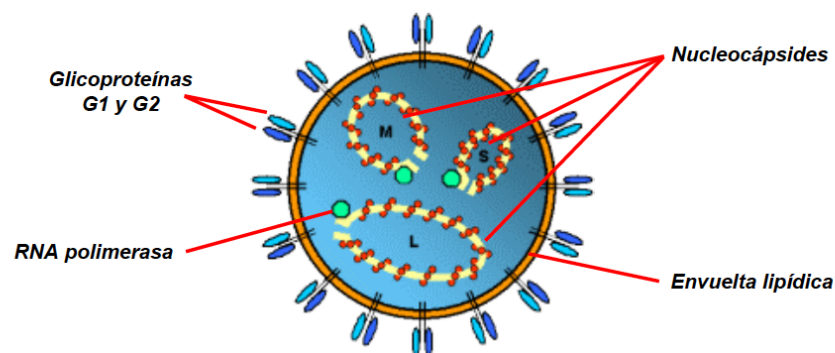


Figura I.1. Morfología del virión de *Bunyaviridae*

I.2.1.2. ORGANIZACIÓN GENÉTICA

El genoma de la familia *Bunyaviridae* está estructurado en tres segmentos de ARN monocatenario y de polaridad negativa denominados L (“large”, grande), M (“medium”, mediano) y S (“small”, pequeño). (Mertz, 1997; Walter y Barr, 2011).

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. En *Phlebovirus* la nucleoproteína se traduce a partir del extremo 3’ de un ARN mensajero (ARN_m) subgenómico complementario al ARN viral (ARN_v) mientras que la proteína NSs se traduce desde un ARN subgenómico de la misma polaridad del ARN_v, en el extremo 5’.

(Mariot, 1989; Elliott, 1991; Giorgi, 1991) (Figura I.2).

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).

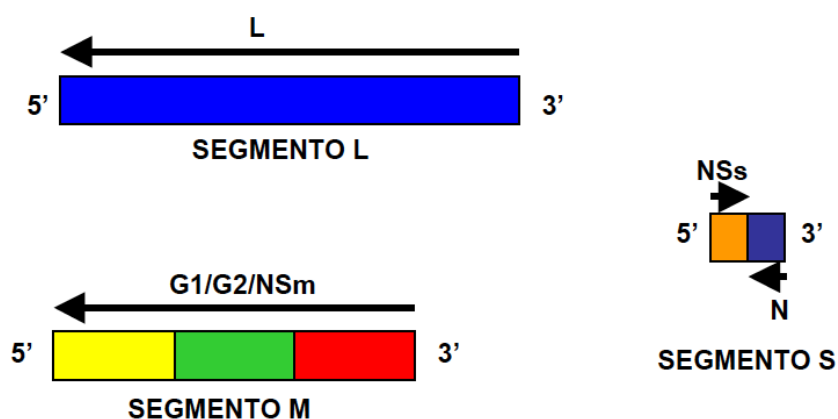


Figura I.2. Organización genética del género *Phlebovirus*

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 nucleocápside, 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 seguida de reacción en cadena de la polimerasa (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 es 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 23 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*. (NCBI Taxonomy, 2012 (<http://ecat-dev.gbif.org>))

Género	Serogrupo	Nº de virus	Virus representativos
<i>Orthobunyavirus</i>	Bunyamwera	21	Bunyamwera
	California	18	California encefalitis La Crosse
	Simbu	2	Oropouche
<i>Hantavirus*</i>	Hantaan	71	Hantaan Seoul
	Puumala	17	Puumala
<i>Nairovirus</i>	Fiebre Hemorrágica Crimea Congo	21	FHCC
<i>Phlebovirus</i>	Fiebre de los flebotomos	40	Nápoles Toscana Rift Valley
	Uukuniemi	6	Uukuniemi
	Sin grupo	60	Sicilia
<i>Tospovirus</i>	Tomato Spotted wilt	7	Tomato spotted wilt
Sin asignar		23	

* Síndrome Distrés Respiratorio Agudo (SDRA) americano: causado entre otros por Virus sin nombre, Black Creek, Bayou, New York. Grupo aparte (no están dentro de los serogrupos Hantaan ni Puumala).

I.2.3. CICLO VITAL

La mayoría de los virus de la familia *Bunyaviridae* se transmiten entre hospedadores 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 hospedadores vegetales por pulgones. Cada género se asocia típicamente con un taxón concreto como vector. Así, *Bunyavirus* se transmite típicamente por mosquitos, *Nairovirus* por garrapatas y la mayoría de *Phlebovirus* por flebotomos. El rango de hospedadores vertebrados que infectan es muy variado, principalmente mamíferos y pájaros.

En la **Figura I.3** se representa a modo de ejemplo el ciclo vital del virus La Crosse, perteneciente a la familia *Bunyaviridae*.

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 hospedadores 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 hospedadores, actividad estacional, etc; y también por los hábitos y atributos del vertebrado, su distribución geográfica, etc. (Beaty y Calisher, 1991).

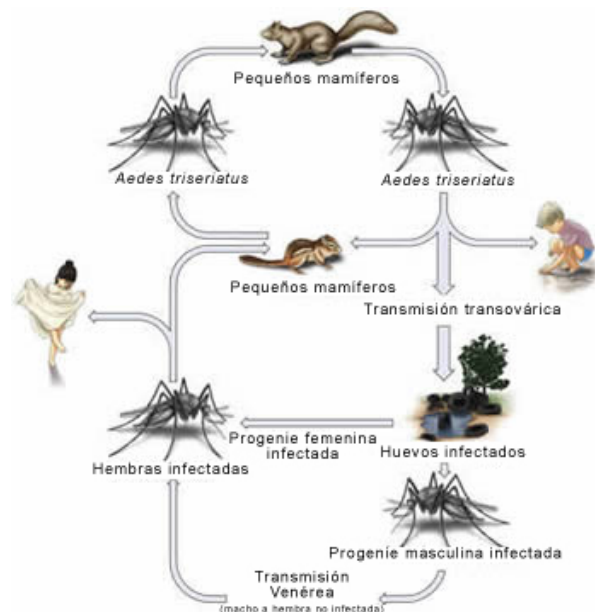


Figura I.3. Ciclo vital del virus LaCrosse (*Bunyaviridae*)
Tomado de Sánchez-Seco y Navarro, 2005 (con autorización).

I.3. GÉNERO *PHLEBOVIRUS*

El género *Phlebovirus* lo constituyen alrededor de 97 miembros, (NCBI Taxonomy, 2012 (<http://ecat-dev.gbif.org>)) separados en complejos antigénicos, que exhiben características moleculares que los distinguen de otros géneros de la familia *Bunyaviridae*.

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 Europa, Asia y África, 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; Alkan y cols, 2013) o el recientemente descrito en China, el virus del Síndrome de trombocitopenia con fiebre severa (SFTS) transmitidos por la especie de garrapatas *Haemaphysalis longicornis* (Yu y cols, 2011, Liu y cols, 2012), 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. EL VECTOR

Los flebotomos son insectos terrestres que pertenecen a la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* y se caracterizan por tener un cuerpo muy similar al de un mosquito, pero con abundantes cerdas y con alas en posición erecta (Lewis, 1982) teniendo en general un vuelo limitado (200 m) (Gil Collado, 1989).

Los géneros *Phlebotomus* y *Sergentomyia* circulan en Europa, Asia y África y el género *Lutzomyia* se distribuye desde el sur de Canadá hasta el norte de Argentina, incluyendo las islas del Caribe (Lewis, 1982).

En América se aprecia una mayor diversidad de especies de flebotomos del género *Lutzomyia* en comparación con las existentes del género *Phlebotomus* en Europa, Asia y África. Esto explicaría el mayor número de flebovirus aislados en el continente americano (Tesh, 1988; Alkan y cols, 2013).

Los flebotomos que habitan en zonas peridomésticas y más antropofílicos son vectores de los flebovirus que causan infección y enfermedad en el hombre, los más conocidos son: *Phlebotomus papatasi*, *P. perniciosus*, *P. perfiliewi*, *L. trapidoi* y *L. ylephiletor* (Karabatsos, 1985).

Los flebovirus que no son transmitidos por flebotomos como el virus del Valle del Rift (RVFV), Arumowot (AMTV) e Itaporanga (ITPV) han sido aislados de mosquitos infectados naturalmente (Karabatsos, 1985). Otro flebovirus, Icoaraci (ICOV), se ha encontrado en ambos, flebotomos y mosquitos. Los mosquitos involucrados en la transmisión de RVFV son *Aedes sp.* y *Culex sp.* (Linthicum, 1985; Diallo, 2005).

Se desconocen los reservorios vertebrados de la mayoría de los flebovirus, aunque se han detectado o aislado en algunos animales salvajes como murciélagos (Boiro, 1987). También se han encontrado evidencias serológicas de infección en pequeños mamíferos pero estos no han llegado a desarrollar la enfermedad (Pretorius, 1997). Uukuniemi es transmitido por garrapatas (Alkan y cols, 2013).

I.3.2. CLASIFICACIÓN DE LOS *PHLEBOVIRUS*

Se pueden distinguir tres grandes grupos: el grupo de “La Fiebre de los Flebotomos”, el grupo Uukuniemi y un tercer grupo sin asignar (Karabatsos, 1985).

Dentro del primer grupo, los virus más importantes desde el punto de vista médico son los virus RVFV, SFVN y VTOS.

En la **Tabla I.4** se presenta la clasificación del género *Phlebovirus*.

Tabla I.4 Clasificación taxonómica del género *Phlebovirus*.(NCBI Taxonomy, 2012)

Género	Serogrupo	Nº de virus	Virus representativos
<i>Phlebovirus</i>	Fiebre de los flebotomos	40	Nápoles (SFVN) Toscana (VTOS) Valle del Rift (RVFV)
	Uukuniemi	6	Uukuniemi
	Sin grupo	60	Sicilia (SFSV)

I.3.2.1. VIRUS DEL GRUPO “FIEBRE DE LOS FLEBOTOMOS”

Este grupo de virus está ampliamente distribuido y comprende 40 virus, de los que los más importantes son los citados: Virus de la Fiebre del Valle del Rift (RVFV), Virus Nápoles (SFVN) y Virus Toscana (VTOS). Aunque desde un punto de vista clínico se puede estudiar también el Sicilia (SFSV), aunque taxonómicamente no pertenezca a este grupo. **(Tabla I.4)**

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). Se aisló una cepa de VTOS del cerebro de un murciélago de la especie *Pipistrellus khuli* (Verani y cols, 1988), así como evidencias serológicas de infección en pequeños mamíferos, aunque no se han observado síntomas de enfermedad en estos supuestos huéspedes vertebrados (Pretorius y cols, 1997). 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., 2001). 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 y otros virus similares, pueda ser el propio vector (Charrel y cols, 2005; Venturi y cols, 2007).

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

En nuestro medio y con respecto a posibles reservorios del VTOS, no se han reconocido ni mamíferos ni aves como potenciales reservorios, si bien se han realizado pocos estudios sobre mamíferos y ninguno sobre aves.

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., 2007; Alkan y cols, 2013).

En un estudio de seroprevalencia de VTOS sobre animales domésticos en la provincia de Granada (Navarro y cols, 2011), se estudiaron posibles reservorios de VTOS que pudieran explicar la persistencia del virus durante los

meses fríos del año, cuando el vector no está circulando. El estudio se realizó sobre animales domésticos de aquellas zonas donde previamente se había detectado VTOS en flebotomos (Sanbonmatsu, 2005).

Se investigó VTOS en 1186 muestras de suero procedentes de caballos, cabras, cerdos, gatos, perros, ovejas y vacas, por serología (IFI), cultivo viral y RT-PCR. Coincidiendo con datos obtenidos por Verani (Verani, 1988) se encontró una alta tasa de seroprevalencia para VTOS (36,2%) en 429 muestras de suero de animales domésticos, lo que demuestra el contacto previo de VTOS con todos ellos. Hay que destacar el elevado porcentaje de positividad en gatos (59,6%) y perros (48,3%) con respecto a cabras, cerdos, ovejas y vacas. 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). 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.

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) 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.

Las muestras de suero de animales domésticos cultivadas en células Vero y posterior RT-PCR en los sobrenadantes no encontraron ningún resultado positivo para VTOS. La RT-PCR realizada directamente de las muestras de suero fue positiva en una cabra. La RT-PCR en tiempo real

utilizada es específica de VTOS y no da reacción inespecífica con otros virus ARN e incluso con otros *Phlebovirus*; (Pérez-Ruiz y cols, 2007).

Se trata de la primera vez en la que se detecta este virus en sangre de un vertebrado no humano; además, 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.

Hasta la fecha el único flebovirus asociado a patología humana detectado en nuestro medio es el VTOS.

VTOS fue aislado por primera vez en 1971 de *Phlebotomus perniciosus* durante un estudio de vigilancia de vectores capturados en Monte Argentario al sur de la provincia de Grosseto en Italia central (Verani y cols, 1980). Es el único flebovirus transmitido por flebotomos con actividad neurotrópica. La infección aguda sigue un curso bifásico, la primera fase presenta los síntomas típicos de fiebre ($>37.5^{\circ}\text{C}$) y dolor de cabeza y después de 7 a 10 días comienzan los síntomas neurológicos en la mayoría de pacientes, sin embargo, el curso clínico es generalmente benigno, se resuelve a corto o medio plazo, sin secuelas neurológicas permanentes (Nicoletti y cols, 1991, Schwarz y cols, 1993, Navarro y cols, 2004). Ocasionalmente la enfermedad se manifiesta con meningoencefalitis, encefalitis sin meningitis (Dionisio y cols, 2001) o puede adquirir un cuadro de meningoencefalitis severa, produciendo coma profundo e hidrocefalia (Baldelli y cols, 2004). La infección neurológica es más frecuente durante el verano, coincidiendo con la mayor actividad del vector (Nicoletti y cols, 1991; Navarro y cols, 2004). En España el primer caso de infección neurológica se detectó en el año 1988 en la ciudad de Granada, encontrándose

desde entonces nuevos casos cada año y siendo los niveles de anticuerpos entre la población de la zona de un 24,9%, nivel que se incrementa con la edad (Sanbonmatsu y cols, 2005; Mendoza-Montero y cols, 1998). Además, se han realizado estudios de seroprevalencia a VTOS en Madrid (Echevarría y cols, 2003), Murcia (Martínez-García y cols, 2007), Mallorca (Leyes y cols, 2011) y Cataluña (Cardeñosa y cols, 2013).

Se ha determinado que existen diferencias en la secuencia nucleotídica de VTOS entre cepas aisladas en España y la cepa italiana, lo que sugiere que en Europa circulan al menos dos genotipos de VTOS (Sánchez-Seco y cols, 2003, Sanbonmatsu y cols, 2005).

Así mismo, recientemente se ha postulado la posible relación epidemiológica de infección por VTOS e infección por *Leishmania*, ambos transmitidos por el mismo vector (Bichaud y cols, 2011; Maroli y cols, 2013).

En cuanto a RVFV, tradicionalmente 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 RVFV 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 RVFV se asocia a abortos y alta tasa de mortalidad, causando importantes pérdidas económicas. En humanos, RVFV 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).

SFVN y SFSV 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 Papatacci”. 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 SFVN y SFSV 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). Ocasionalmente producen exantemas y/o infección respiratoria aguda autolimitada en meses cálidos (Dionisio y cols, 2003; Depaquit y cols, 2010).

Posteriores aislamientos y estudios de seroprevalencia demuestran que SFVN y SFSV 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; Alkan y cols, 2013). No se conoce el reservorio natural de estos virus, en caso de que lo tuvieran.

Recientemente se ha descrito el virus Massilia, un nuevo flebovirus de la familia *Bunyaviridae* aislado en flebotomos en el sudeste de Francia, en Marsella, englobado dentro del serocomplejo Nápoles (SFVN) y su implicación clínica está aun por determinar. (Charrel y cols, 2009).

En la **Tabla I.5** se indican algunos de los virus que componen los diferentes complejos antigénicos dentro del género *Phlebovirus* con la abreviatura correspondiente según El ICTV, el lugar geográfico en el que se han detectado y su vector principal cuando se conoce.

Tabla I.5: Virus Del grupo de la Fiebre de los Flebotomos.

Complejo antigénico	Nombre del virus (abreviación)	Distribución geográfica	Vector
Bujaru	Munguba (MUNV)	América del Sur	F
Candiru	Alenquer (ALEV)	América del Sur	-
	Candiru (CDUV)		-
	Itaituba (ITAV)		-
	Nique (NIQV)	América del Norte	F
	Oriximina (ORXV)	América del Sur	F
	Turuna (TUAV)		F
Chilibre	Cacap (CACV)	América del Norte	F
	Chilibre (CHIV)		F
Punta Toro	Buenaventura (BUEV)	América del Sur	F
	Punta Toro (PTV)	América del Norte y Sur	F
Fiebre Del Valle del Rift (RVFV)	Icoaraci (ICOV)	América del Sur	M, F
	Belterra (BELTV)	América del Sur	-
	Fiebre Del Valle del Rift (RVFV)	África	M
Salehabad	Salehabad (SALV)	Asia	F
Karimabad (Palacios y cols, 2013b)	Karimabad (KARV)	Asia	F
Nápoles	Nápoles (SFNV)	África, Asia y Europa	F
	Tehran (TEHV)	Asia	F
	Toscana (TOSV)	Europa	F
	Arbia (ARBV)	Italia	F
	Massilia	Francia	F
	Punique	Túnez	F
	Granada virus (VGR)	España	F

* F: flebotomo; M: mosquito.

I.3.2.1.1. VIRUS UUKUNIEMI

Pertenece a este grupo, virus Uukuniemi, virus EgAn 1825-61, virus Fin V707, virus Chizé y virus Zaliv Terpenia. (Palacios y cols, 2013a).

I.3.2.1.2. VIRUS NO ASIGNADOS

60 virus no están asignados a ningún grupo. En la **Tabla I.6** se citan algunos de ellos:

Tabla I.6. Virus No asignados.

No asignados	Arboledas (ADSV)	América del Sur	F
	Anhanga (ANHV)	América del Sur	-
	Aguacate (AGUV)	América del Sur	F
	Arumowot (AMTV)	África	M
	Caimito (CAIV)	América del Norte	F
	Chagres (CHGV)	América del Norte	F
	Courfou (CFUV)	Europa	F
	Gabek Forest (GFV)	África	-
	Gordil (GORV)	África	-
	Itaporanga (ITPV)	América del Sur	M
	Odrenisrou (ODRV)	África	M
	Pacui (PACV)	América del Sur	F
	Río Grande (RGV)	América del Norte	-
	Sicilia (SFSV)	África, Asia y Europa	F
	Saint Floris (SAFV)	África	-
Urucuri (URUV)	América del Sur	-	

En este grupo estarían también Phlebovirus Gr29, Gr36, Gr44, Gr49, Gr52, Gr65, Gr98 (España/2004).

I.4. VIRUS GRANADA

I.4.1. ANTECEDENTES DE INFECCIÓN POR FLEBOVIRUS EN ESPAÑA

De los diferentes flebovirus que se han detectado como patógenos humanos en el área mediterránea, en España el único miembro del género *Phlebovirus* relacionado con patología humana es una nueva variante de virus Toscana (VTOS), asociado fundamentalmente a pacientes con clínica neurológica, meningitis linfocitaria y ocasionalmente meningoencefalitis, (Navarro y cols, 2004; Serata y cols, 2011; Bartels y cols, 2012) y en menor medida a procesos menos graves como exantemas, durante los meses cálidos, cuando circula el vector. (Mendoza-Montero y cols, 1998; Navarro y cols, 2004; Sanbonmatsu y cols, 2009; Tappe y cols, 2010).

Nuestro Laboratorio ha llevado a cabo investigación sobre VTOS en nuestro medio y ha desarrollado una técnica de diagnóstico molecular, de uso actual generalizado en los laboratorios de virología clínica (Pérez-Ruiz y cols, 2007).

Además de VTOS, en otros países del área mediterránea, otros flebovirus se han implicado en patología humana, fundamentalmente Virus Nápoles (SFVN) y Virus Sicilia (SFSV), que no producen cuadros neurológicos pero sí síndromes febriles (fiebre de los tres días o Fiebre Papatacci) y ocasionalmente exantemas y/o infección respiratoria aguda autolimitada en meses cálidos como se comentó anteriormente. (Dionisio y cols, 2003; Depaquit y cols, 2010).

Sin embargo, SFVN y SFSV no se han detectado en España en humanos ni en vectores.

Desde 1988 en que se detectaron los primeros casos de infección por VTOS hasta la fecha se han descrito en toda la península con excepción del

área Cantábrica, casos diagnosticados por diferentes procedimientos (PCR, cultivo y/o serología). La inmensa mayoría corresponden a pacientes con meningitis linfocitaria (Mendoza-Montero y cols, 1998; Echevarría y cols, 2003; Navarro y cols, 2004; De Ory-Manchón y cols, 2007), y excepcionalmente a encefalitis o cuadros no neurológicos (Sanbonmatsu y cols, 2009).

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

En el año 2003 inició su actividad la RED EVITAR (Red de Investigación G03/059), cuyo fin primordial fue la detección y vigilancia de las infecciones víricas humanas transmitidas por artrópodos y/o roedores en España. Entre los nodos que configuraron la Red se encontraba el “Subproyecto Toscana”, y cuyos objetivos básicos fueron, establecer la implicación real de VTOS en patología neurológica humana, realizar estudios de seroprevalencia de VTOS en población general de la provincia de Granada y determinar el vector para su transmisión en nuestro medio.

Se confirmó que VTOS tiene importancia por su implicación en cuadros neurológicos en verano (segundo agente tras enterovirus).

Filogenéticamente los VTOS detectados en España mantienen hasta un 20% de diferencia en la secuencia de nucleótidos, según los fragmentos analizados, con respecto a los VTOS aislados en Italia, por lo que actualmente se ha admitido la existencia de 2 variantes o genotipos de VTOS, el italiano y el español (Sanbonmatsu y cols, 2005), lo que podía explicar las discrepancias existentes previamente en los métodos moleculares existentes para el diagnóstico. (Sánchez-Seco y cols, 2003).

Existe una alta prevalencia de infección por VTOS en nuestro medio (24,9% en el conjunto de la población general y cercana al 60% en la población

mayor de 65 años), aumentando progresivamente con la edad (Sanbonmatsu y cols, 2005); lo que contrasta con el aparentemente bajo número de infecciones que tienen traducción clínica, a diferencia de lo que ocurre en otros países como Italia, con seroprevalencias similares, donde se detectan un mayor porcentaje de casos clínicos.

Este hecho puede ser debido a que la variante española de VTOS, sea menos virulenta que la Italiana, o a que existan otros virus filogenéticamente cercanos, menos virulentos, que de alguna manera puedan provocar en la población general respuestas inmunes que protejan a su vez de la infección grave por VTOS, como puede estar sucediendo en Europa en el caso de virus West Nile (VWN); ya que se han descrito flavivirus, emparentados con VWN, pero menos virulentos, a los que están expuestos la población general, y que pueden en gran medida condicionar que en gran parte de Europa la infección por VWN se limite a casos puntuales, a diferencia de lo que ocurre en otras áreas geográficas, donde puede llegar a ocasionar verdaderas epidemias (Sánchez-Seco y Navarro, 2005).

En este mismo sentido, a pesar de que nuestro país se haya dentro del área de distribución de la leishmaniasis canina y obviamente, de su vector que es el mismo que transmite VTOS: *P. perniciosus*. De hecho, los niveles de anticuerpos detectados en perros de nuestro país indican actividad del vector por todo el territorio nacional (Molina y cols, 2006); el número de casos diagnosticados de infección por VTOS en España es bajo. Las causas pueden responder a cierto desconocimiento de algunos aspectos relacionados con este virus, o bien al bajo índice de sospecha clínica.

El Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, como Laboratorio de Referencia de Virus en Andalucía, aplicando técnicas de PCR genéricas para flebovirus en LCR de pacientes con cuadros neurológicos, nunca ha detectado ningún flebovirus que no sea VTOS. Para detectar los distintos serotipos de VTOS se utilizó la técnica de biología molecular citada previamente (Pérez-Ruiz y cols, 2007).

Recientemente en los estudios llevados a cabo dentro del proyecto de la Consejería de salud (305/05: “Implicación de virus Toscana como patógeno humano en procesos no neurológicos de la comunidad y detección de sus posibles reservorios en la provincia de Granada”), hemos constatado que VTOS sólo muy rara vez produce cuadros no neurológicos (Pérez-Ruiz y cols, 2007).

I.4.2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Como consecuencia de los estudios realizados sobre vectores dentro de del subproyecto Toscana de la RED EVITAR, en 11 lotes de flebotomos se aisló otro flebovirus no VTOS, hasta ese momento no descrito y que se catalogó como Virus Granada (VGR).

Los análisis filogenéticos llevados a cabo sobre VGR demostraron que está próximo a Virus Nápoles, patógenos frecuentes en algunos países del área mediterránea como causante de síndromes febriles hasta la década de los setenta (Fiebre Papatacci) (Collao y cols, 2010).

VGR se ha localizado posteriormente en otras regiones de España como Baleares y Cataluña también a partir de flebotomos, y los resultados preliminares indican que puede afectar a humanos (Collao y cols, 2010).

Tras el análisis filogenético del genoma completo de VGR (Collao y cols, 2010), se ha confirmado que pertenece al serocomplejo SFVN, y que en gran medida está emparentado con el virus Massilia, que como se indicó anteriormente es otro nuevo flebovirus descrito en el sureste de Francia (Charrel y cols, 2009; Alkan y cols 2013).

La tasa de infección de VGR en flebotomos está en torno al 0,2%, muy superior a la de VTOS, que se situaba en el 0,05%. (Sanbonmatsu, 2005).

Introducción

Actualmente no existe un estudio poblacional amplio que estudie la seroprevalencia de infección por VGR en población humana asintomática.

Además se desconoce en qué medida son capaces de infectar a humanos y en su caso ser responsable de patología infecciosa.

Dado que VGR se ha incluido en el serocomplejo SFVN, cabe especular que podría producir cuadros clínicos similares a los de otros virus del mismo serocomplejo.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es evaluar la implicación real de un nuevo flebovirus detectado en nuestro medio, el virus Granada, como agente infeccioso en patología humana.

Los objetivos específicos son:

- 1.** Estudiar la seroprevalencia de la infección por virus Granada en la población general de la provincia de Granada, comparándola con los datos de seroprevalencia de virus Toscana.
- 2.** Evaluar la implicación de virus Granada en cuadros clínicos no neurológicos, en pacientes atendidos ambulatoriamente en Centros de Salud.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA

III.1.1. DISEÑO

Se trata de un estudio descriptivo transversal (prevalencia).

III.1.2. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y PERIODO DE ESTUDIO

Se estudiaron muestras de suero procedentes de 920 sujetos, obtenidas dentro del Proyecto de la RED EVITAR para investigación de seroprevalencia de VTOS, durante septiembre-diciembre 2003 y congeladas a -20°C . Estas muestras se estratificaron por edad, sexo y localización geográfica. A todos los sueros se les había realizado previamente detección de IgG frente a VTOS (Tesis Doctoral “Infección neurológica por virus Toscana en la provincia de Granada: estudio clínico-epidemiológico, Dra. Sanbonmatsu, con su autorización).

En razón a la procedencia de los sueros, para determinar posibles diferencias en la seroprevalencia de infección por virus Granada 25 y Granada 82 atendiendo al hábitat, se establecieron en la provincia de Granada cinco áreas geográficas diferentes: capital, metropolitana, sur, oeste/suroeste, y norte/noreste (**Figura III.1**).



Figura III.1. Áreas geográficas de la provincia de Granada establecidas para estudio de seroprevalencia de virus Granada.

Los datos registrados fueron la edad, sexo y área de procedencia del donante o paciente. Por grupos de edad, el 20% correspondía a sujetos menores de 18 años, el 65% a sujetos con edad comprendida entre 18 y 65 años, y el 15% eran mayores de 65 años.

El número de sueros incluidos en cada grupo se calculó de acuerdo con los datos demográficos y censales de la provincia de Granada, de manera que la muestra fuese representativa de la población de toda la provincia de acuerdo con los datos procedentes del Instituto Nacional de Estadística (cifras de población referidas al 1 de enero de 2002) (INE, 2002). La distribución de la población por grupos de edad se obtuvieron de datos procedentes del Instituto de Estadística de Andalucía (cifras referidas al año 2001) (IEA, 2001).

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

Los resultados de seroprevalencia obtenidos con VGR, se han comparado con los obtenidos por nuestro grupo, en la misma población para VTOS (Sanbonmatsu, 2005).

III.1.3. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS IgG FRENTE A VIRUS GRANADA.

Para determinar la seroprevalencia frente a VGR la detección de IgG específica se realizó mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando portas de 18 pocillos preparados con cultivos celulares (Vero) sin infectar e infectados con cepas de VGR de nuestra colección (Ph125; 2004) y suero anti-IgG humana marcada con fluoresceína (Fluoline H (Biomerieux ®). Los sueros se usaron en diluciones dobladas desde 1/10 hasta 1/320 en

Solución Salina Fisiológica (SS). Se valoraron como positiva aquella dilución en la que se observó fluorescencia en portas infectados y no en los portas sin infectar, en una dilución dada (ver apartado III. 3. 1).

III.1.4. NEUTRALIZACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO (ECP)

A los sueros con IFI IgG positivos frente a VGR se realizó prueba confirmatoria de neutralización (SNA) de efecto citopático en cultivo celular (Grist, 1974), usando monocapas de células Vero crecidas en microplacas de fondo plano de 96 pocillos y cepas de VGR y TOSV genotipo español de nuestra colección (Phi25; 2004 y VTOS 62100, respectivamente) con valoración previa de la TCID₅₀. (ver apartado III. 5. 3)

Se utilizaron 100 µl de suero en diluciones dobladas en medio esencial mínimo (MEM) sin suplementación de suero fetal bovino (SFB) a partir de 1/10 hasta 1/320, enfrentadas a 100 µl con 100 TCID₅₀ de VGR y VTOS. Las placas se leyeron diariamente hasta la aparición de ECP en los pocillos de control preparados con las cepas sin neutralizar (ver apartado III. 3. 2).

III.2. ESTUDIO CLÍNICO

III.2.1. DISEÑO

Se trata de un estudio prospectivo.

III.2.2. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y PERIODO DE ESTUDIO

Como se desconocía la proporción de casos positivos para el cálculo del tamaño muestral se asumió 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% necesitaríamos unos 96

individuos. Si se quería que la precisión fuese del 7% se necesitarían 196 individuos y para obtener una precisión del 5% serían necesarios al menos 384 individuos.

La detección de casos humanos se realizó por facultativos de Centros de Salud del área sanitaria de Granada Norte y del área de consultas externas del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN) de Granada.

Se utilizaron sueros de fase aguda, tomados entre los días 5 y 10 del inicio del cuadro clínico, de pacientes atendidos en atención primaria de nuestra Área Sanitaria, de mayo a octubre, meses en los que circula el vector en nuestro medio, durante 4 años consecutivos (del 2008 al 2011).

Se han incluido pacientes con alguno de los siguientes cuadros clínicos: síndrome febril agudo de menos de siete días de evolución, exantema y/o infección respiratoria aguda; y en los que con las pruebas serológicas realizadas de rutina en nuestro laboratorio, para descartar otros posibles patógenos, se obtuvieron resultados negativos. Estas determinaciones fueron para cada proceso, las que se indican a continuación:

- Síndrome febril agudo (Brucelosis, virus Epstein Barr, citomegalovirus, fiebre Q, Rickettsias)
- Exantema (Rubéola, sarampión, eritrovirus B19, Rickettsias),
- Infección respiratoria aguda (Chlamydia spp, Micoplasma, Fiebre Q, Legionella)

En todos ellos resultados negativos.

Los pacientes aceptaron participar en el estudio mediante consentimiento informado (anexo III.5.2).

Los criterios de exclusión serán aquellos pacientes de los que no se obtenga consentimiento informado o se determine otra etiología causante del cuadro febril.

III.2.3. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS IgM FRENTE A VIRUS GRANADA

A cada suero, tras adsorber para eliminar el factor reumatoide (Rf) (Siemens®), se le realizó una dilución 1/10 en SS para la detección de IgM específica frente a VGR mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando portas de 18 pocillos preparados con cultivos celulares (Vero) sin infectar e infectados con cepas de VGR de nuestra colección (Phl25; 2004), y suero anti cadena μ de IgM humana (IgG de cabra anti cadena μ Fluoline M (Biomerieux®). (ver apartado III. 3. 1)

III.2.4 DETECCIÓN DE IgM FRENTE VTOS

A los sueros con IgM positiva frente a VGR se les determinó además IgM frente a VTOS mediante ELISA IgM (Enzywell Toscana Virus IgM, Diesse, Italy).

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

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.

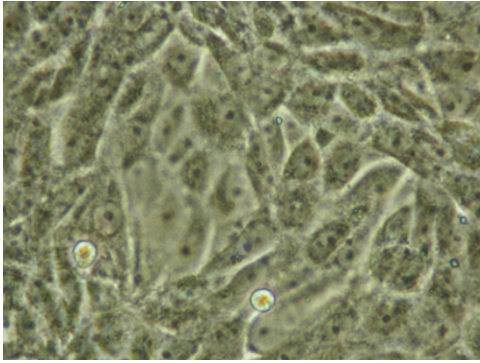
La muestra de suero se considera positiva si el cociente entre la absorbancia de ésta y la del punto de corte es mayor de 1,2. La muestra es negativa si este cociente es menor de 0,8. Si el valor de absorbancia de la muestra está comprendida entre el 20% del valor del punto de corte se considerará el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

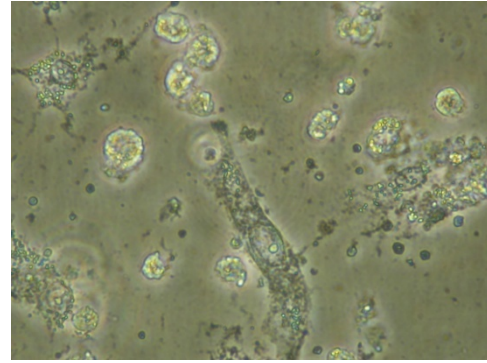
III.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

III.3.1. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Se utilizó una prueba de inmunofluorescencia para detección de anticuerpos frente a VGR. Para ello se infectó un frasco de 250 ml con células Vero con este virus y se incubó hasta visualización de ECP (VTOS y otros *Phlebovirus* crecen entre 3-7 días de incubación, produciendo destrucción masiva de la monocapa de células Vero, sin que afecte al resto de líneas celulares) (**Figura III.2 y Figura III.3**).



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)

A: Preparación de las extensiones: Se despegaron las células de la pared de cada frasco con esferas de cristal estériles, sin tirar el medio de cultivo, y el contenido se distribuyó en tubos estériles de 10 mL para posteriormente centrifugarlos a 1000x g durante 10 minutos. Tras decantar el sobrenadante se resuspendieron las células del sedimento en 1 mL de tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. A continuación se descartó el sobrenadante, dejando sólo 1 mL del mismo en el que se resuspendieron las células.

En portaobjetos para fluorescencia de 18 pocillos, se depositaron 10 μ L de la suspensión celular infectada con VGR. Tras dejar secar el portaobjetos a temperatura ambiente se fija con acetona fría a -20°C durante 10 min. Los portaobjetos se guardaron a -80°C hasta su uso.

B: Reacción de inmunofluorescencia indirecta : Se colocaron 10 μ L de la dilución de trabajo del suero (1/20 para estudio de seroprevalencia y 1/10 para estudio clínico) 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, para el estudio de seroprevalencia se añadió 10 μ L de anti-IgG humana marcada con fluoresceína a su dilución de trabajo (1/200) y

para el estudio clínico 10 μ L de anti cadena μ de IgM humana (Fluoline M (Biomerieux®) a dilución 1/25, en PBS pH 7,5 con azul de Evans al 1:10.000. A continuación se incubó 30 min a 37°C en cámara húmeda. Tras ello se lava en agitación ligera durante 10 min con PBS pH 7,2. Tras dejar secar, se añade el medio de montaje, glicerina tamponada, y se coloca un cubreobjetos para observar la preparación en microscopio de fluorescencia a 400X.

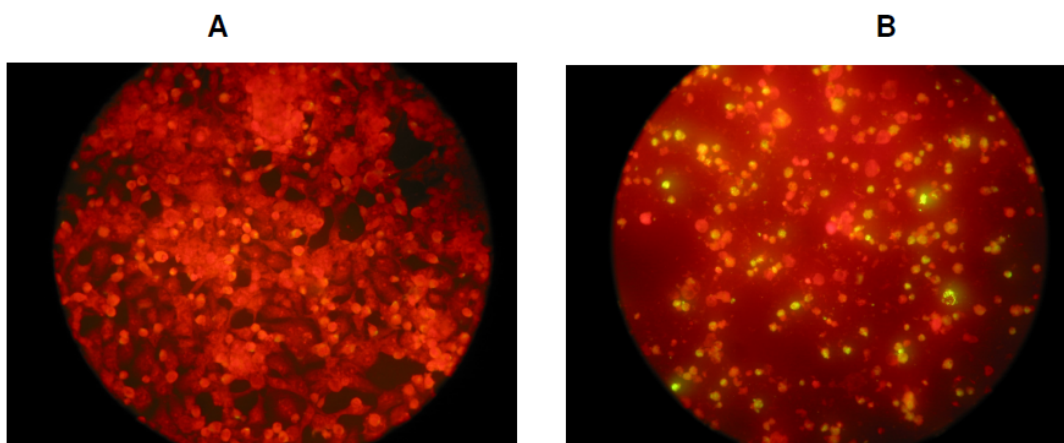


Figura III.3. Patrón de fluorescencia observado en portaobjetos de células no infectadas (A) frente a infectadas (B), utilizando suero positivo a VGR.

III.3.2. NEUTRALIZACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO (ECP)

Se basa en la capacidad de los antisueros de neutralizar específicamente la infectividad de un virus, el cual no producirá su ECP característico. Se realiza normalmente en cultivos celulares para la caracterización de virus aislados, o bien para detectar la presencia de anticuerpos frente a determinados virus (Hsiung, 1994).

Esta técnica, en nuestro caso sirve para determinar si el suero de un paciente contiene anticuerpos neutralizantes específicos frente a VGR. Para ello, se enfrentan diluciones dobles seriadas del suero problema a una cepa conocida y valorada de VGR (Phi25; 2004) y VTOS 62100. Se considera que la

muestra contiene anticuerpos específicos frente a ellos, si neutraliza al virus evitando el ECP que produciría sobre el cultivo celular en células Vero.

Material:

1. Células sensibles al virus a probar.
2. Suspensión del virus, conteniendo 100 TCID₅₀/ 0,1 mL (Anexo III.5.3).
3. Diluciones dobladas de suero (desde 1/10 a 1/320) con MEM 0% SFB.

Realización de la técnica:

- Se mezclan volúmenes iguales de una dilución del virus problema de 100 TCID₅₀ por 0,1 mL de suero del paciente en las diluciones establecidas.
- Se incuba esta mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Se inoculan 200 µL de las mezclas en placa microtiter con células Vero crecidas previamente.
- Se realizan lecturas diarias de los cultivos durante 5 a 7 días.
- Si el ECP de 100 TCID₅₀ se inhibe completamente con una dilución determinada de suero, se considera que éste ha neutralizado el virus, siendo el título la inversa de la máxima dilución del suero que es capaz de inhibir el ECP.

III.4. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

III.4.1. PARA EL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

A todos los pacientes seleccionados, previo consentimiento informado (anexo III.5.2) se les realizó ficha de obtención de datos clínico-epidemiológicos (anexo III.5.1) que quedaron registrados en base de datos (MS Access, Office XP) para posteriores estudios estadísticos.

III.4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó con el fin de estimar la proporción de pacientes en los que la etiología del síndrome febril era el VGR 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 cuya etiología es VGR y los que no.

Las variables cualitativas se compararán mediante el test de chi-cuadrado.

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

III.5. ANEXOS

III.5.1. ENCUESTA CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA

IMPLICACIÓN DE UN NUEVO FLEBOVIRUS, VIRUS GRANADA, EN PATOLOGÍA HUMANA, ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO.

FICHA DE DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL, INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA O EXANTEMA.

Nº HISTORIA CLÍNICA: _____

INICIALES: _____

Nº REGISTRO: ____

1. DATOS DEMOGRÁFICOS

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

2. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

- 2.1 Viajes recientes (<1 mes): __ No __ Si (Especificar lugar y fechas)
- 2.2. Animales domésticos habituales: __ No __ Si (especificar)
- 2.3. Contacto ocasional animales (< 1mes): __ No __ Si (especificar)
- 2.4. Actividades al aire libre (< 1mes): __ No __ Si (especificar)
 (Campo, humedales, playa,...) Lugar:
- 2.5. Picaduras / mordeduras de animales __ No __ Si (especificar):
 (< 1mes) Animal:
 Lugar:
 Fecha:

2.6. Trabajo:

2.7. Contactos próximos con cuadros sugestivos de viriasis (catarro vías altas, cuadro pseudogripal, gastroenteritis, meningoencefalitis...) (< 1 mes)

3. ANTECEDENTES PATOLÓGICOS O ENFERMEDADES/CONDICIONES DEBILITANTES

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

4. CLÍNICA

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

No Si (especificar)

b) Enfermedad actual

- 4.1. Fecha inicio __/__/__
- 4.2. Temperatura máxima: __ °C
- 4.3. Malestar general
- 4.4. Cefalea
- 4.5. Mialgias
- 4.6. Artralgias
- 4.7. Síntomas respiratorios
- 4.8. Rash cutáneo
- 4.9. Lesiones cutáneo-mucosas
- 4.10. Síntomas gastrointestinales
- 4.11. Hepato/espleno/adenomegalias
- 4.12. Otras (especificar)

5. DATOS ANALÍTICOS

SUERO FASE AGUDA

SUERO FASE CONVALESCIENTE

- 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 VGR

5.16. IgM Neg Pos Neg Pos

5.17. IgG Neg Pos (título): Neg Pos (título):

III.5.2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza: Algunos virus llamados flebovirus, están implicados en procesos patológicos en el hombre, principalmente en forma cuadros febriles leves. Estos virus se transmiten al hombre por la picadura de un mosquito, el flebotomo, muy común en nuestro medio. Este mosquito aparece sólo en los meses de verano. La finalidad de este estudio es: conocer la implicación real de estos virus en procesos no neurológicos, durante los meses de verano.

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 usted 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.

Importancia:

La finalidad de este estudio es conocer la implicación real de estos virus en procesos no neurológicos, durante los meses de verano.

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.

Con ello se beneficiará usted y otros pacientes que puedan presentar cuadros parecidos, que pueden quedar sin diagnosticar correctamente.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

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.

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

IMPLICACIÓN DE UN NUEVOS FLEBOVIRUS, VIRUS GRANADA, EN PATOLOGÍA HUMANA. ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO.

Yo (Nombre y Apellidos):

.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio **IMPLICACIÓN DE UN NUEVO FLEBOVIRUS, VIRUS GRANADA, EN PATOLOGÍA HUMANA. ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO.**
- He recibido suficiente información sobre el estudio **IMPLICACIÓN DE UN NUEVO FLEBOVIRUS, VIRUS GRANADA, EN PATOLOGÍA HUMANA. ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO.**
- He hablado con el profesional sanitario informador:
.....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.

- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado*
IMPLICACIÓN DE UN NUEVO FLEBOVIRUS, VIRUS GRANADA, EN
PATOLOGÍA HUMANA. ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO.

Firma del paciente
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional
sanitario informador

Nombre y apellidos:
Fecha:

Nombre y apellidos:
Fecha:

III.5.3. CÁLCULO DE LA DOSIS INFECTIVA 50% DE UN VIRUS TRAS CRECIMIENTO EN CULTIVO CELULAR (TCID₅₀) (MÉTODO DE REED Y MUENCH)

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

Infectividad

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

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

B= n° acumulativo de infectados

C= n° acumulativo de no infectados

- A continuación, aplicar la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Infectividad sobre el 50\%} - 50\%}{\text{Infectividad sobre el 50\%} - \text{Infectividad bajo el 50\%}}$$

- En el ejemplo: $83-50/83-40= 0,7$. Esta cifra se sumaría al exponente de la solución que quedaba por encima del 50% ($10^{-4,7}$).
- Con esta fórmula, obtenemos la dilución de esta suspensión de virus que contiene 1 TCID₅₀/0,1 ml (dosis de virus que infecta a la mitad de los cultivos celulares en que se inocula)
Para calcular la dilución de virus que contenga 100 TCID₅₀ se aplica la siguiente fórmula

$$\text{Log título TCID}_{50} + 2 = \text{Log de la suspensión que contiene 100 TCID}_{50}$$

IV. RESULTADOS

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

IV.1.1. SEROPREVALENCIA DE INFECCIÓN POR VIRUS GRANADA, UTILIZANDO INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Los datos del estudio, realizado por detección de IgG anti VGR mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) muestran una alta tasa de seroprevalencia de la infección por VGR en la población general (15,8%) (Tabla IV.1).

Tabla IV.1. Prevalencia de IgG anti virus Granada estudiada por IFI en la población de Granada, por áreas geográficas y grupos de edad.

			Grupos de edad								p
			≤ 15 años		16-40 años		41-65 años		> 65 años		
Área	N	Positivos (%) [*]	N	Positivos (%)	N	Positivos (%)	N	Positivos (%)	N	Positivos (%)	
Capital	270	45 (16.7)	45	2 (4.4)	133	21 (15.8)	60	13 (21.7)	32	9 (28.1)	0.029
Metropolitana	257	46 (17.9)	33	4 (12.1)	123	22 (17.91)	60	16 (26.7)	41	4 (9.8)	0.125
Sur/ Costa Alpujarra	182	16 (8.8)	29	1 (3.4)	72	6 (8.3)	54	5 (9.3)	27	4 (14.8)	0.515
Oeste/suroeste	72	11 (15.3)	6	2 (33.3)	37	6 (16.2)	20	3 (15)	9	0 (0)	0.368
Norte/noreste	139	27 (19.4)	16	4 (25)	69	13 (18.8)	35	8 (22.9)	19	2 (10.5)	0.669
Total	920	145 (15.8)	129	13 (10.1)	434	68 (15.7)	229	45 (19.7)	128	19 (14.8)	

% positivos del total de sueros analizados en cada grupo.

* p= 0.058 comparando la porcentajes de seroprevalencia entre distintas áreas geográficas.

Contrastando estos resultados, con los del estudio realizado previamente con VTOS, se observa que el 40% de sueros (58 de 145) con IgG positiva frente a VGR, presentan también anticuerpos frente a VTOS (**Tabla IV.2**).

Tabla IV.2. Resultados de de la detección de IgG frente a virus Granada y virus Toscana.

		IgG VTOS		
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
IgG VGR	NEGATIVO	600	175	775
	POSITIVO	87	58	145
	TOTAL	687	233	920

Si nos centramos exclusivamente en los resultados obtenidos por grupos de edad, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en razón a la edad ($p= 0,120$) cuando se analizan globalmente (**Figura IV.1**), la prevalencia sí aumenta de forma significativa con la edad, en menores de 65 años ($p=0,035$). A partir de esta edad la seroprevalencia disminuye con respecto al grupo anterior, a cifras similares al del grupo de 16-40 años (diferencia no significativa; $p=0,256$).

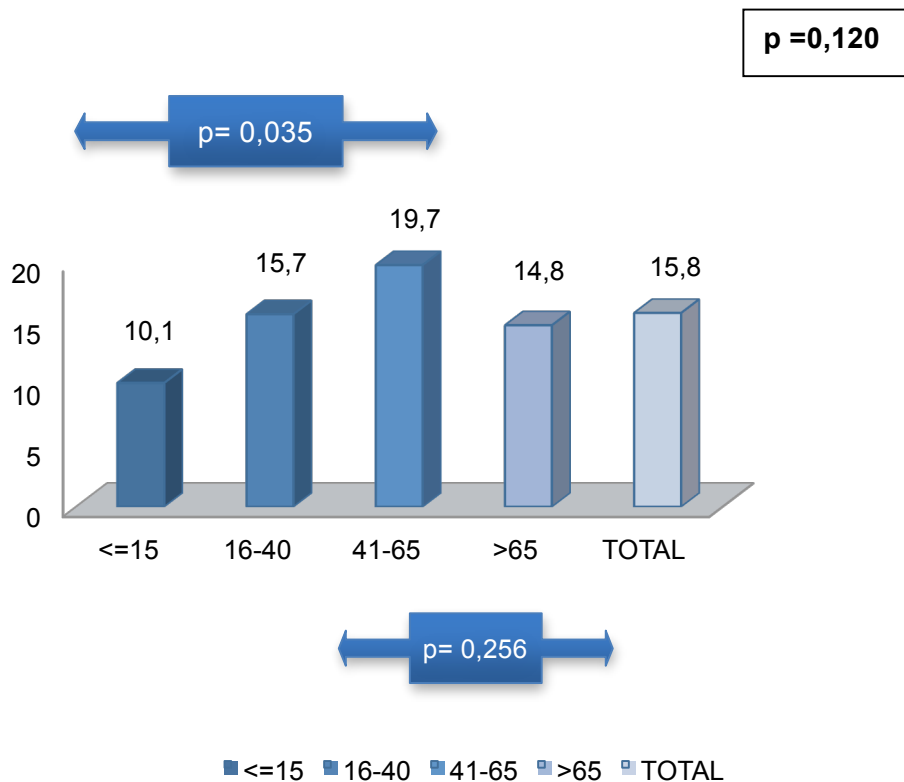


Figura IV.1. Seroprevalencia de IgG anti virus Granada en la población de la provincia de Granada (distribución por edad).

Si se comparan estos datos, con los obtenidos en la misma población en el estudio de seroprevalencia para VTOS, la mayor diferencia se observa en el grupo de mayores de 65 años, donde en lugar de incrementarse la tasa de seroprevalencia, como ocurría frente a VTOS, en el caso de VGR disminuye (Figura IV.2).

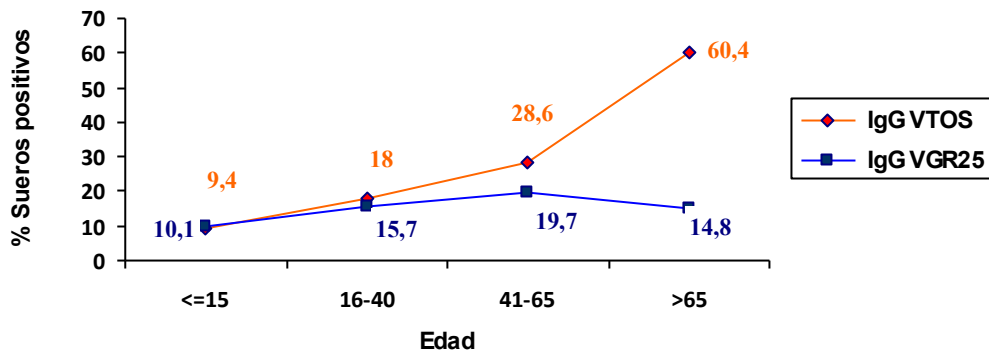


Figura IV.2. Comparación entre los resultados de seroprevalencia de VGR y VTOS en la población general de la provincia de Granada, por grupos de edad.

(Datos de seroprevalencia de VTOS tomados del trabajo de tesis doctoral de Dra Sara Sanbonmatsu (*Infección neurológica por Virus Toscana en la provincia de Granada: Estudio clínico-epidemiológico, 2005*, con autorización)

Con respecto al sexo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,809$) (**Figura IV.3**).

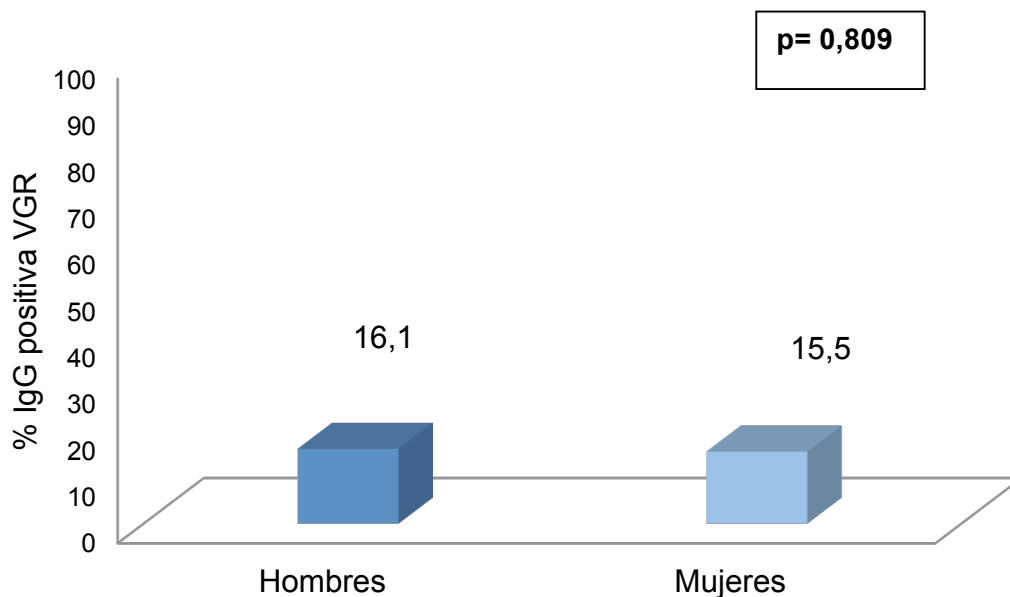


Figura IV.3. Seroprevalencia de IgG anti virus Granada en la provincia de Granada (Distribución por sexos).

Realizando la distribución por áreas geográficas, comparándolas conjuntamente o separándolas en población urbana y rural, tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas, ($p= 0,058$) (**Figura IV.4**), y ($p= 0.621$) (**Figura IV.5**) respectivamente.

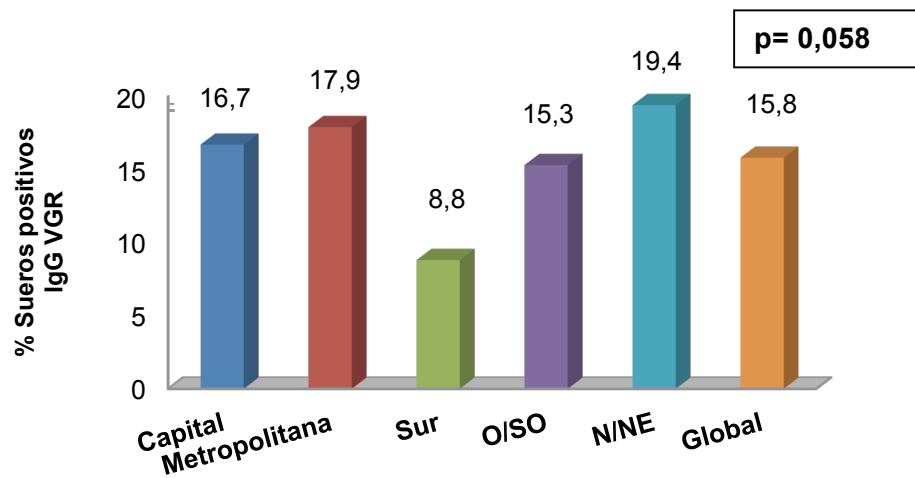


Figura IV.4. Seroprevalencia de IgG anti virus Granada en la provincia de Granada (distribución por áreas geográficas).

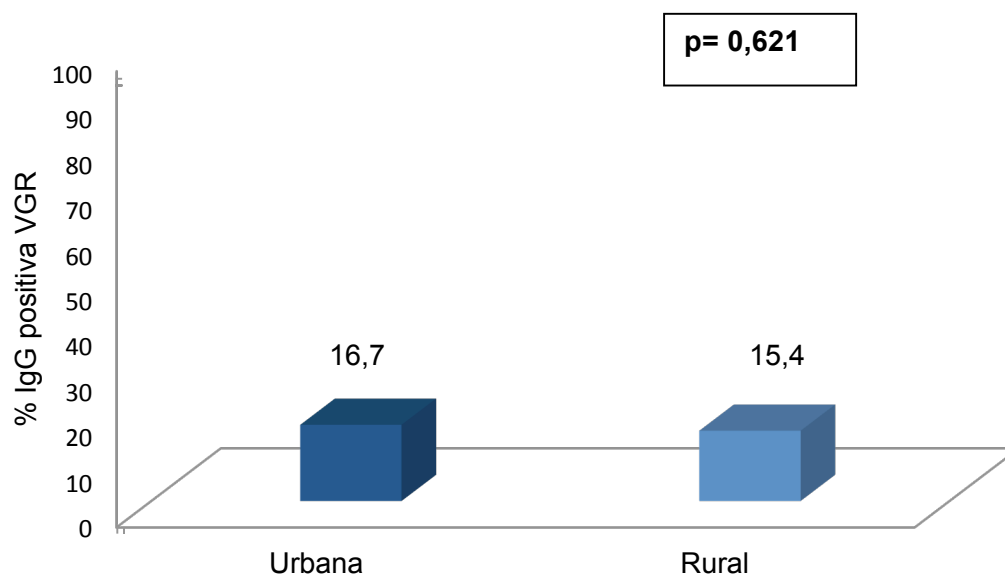


Figura IV.5. Seroprevalencia de IgG anti virus Granada en la población urbana (capital) y en la población rural (el resto de las áreas geográficas de la provincia).

Si se compara la seroprevalencia en el área Sur/Costa Alpujarras, (donde existe la menor prevalencia), con el resto de áreas geográficas (8,8 vs 17,5), se observa que las diferencias son significativas ($p= 0,004$) (**Figura IV.6**). Mientras que entre el área Norte/Noreste, donde encontramos la mayor seroprevalencia y el resto (excepto con el área Sur/Costa Alpujarra) (19,4 vs 15,1), no existen diferencias significativas ($p=0,198$) (**Figura IV.7**).

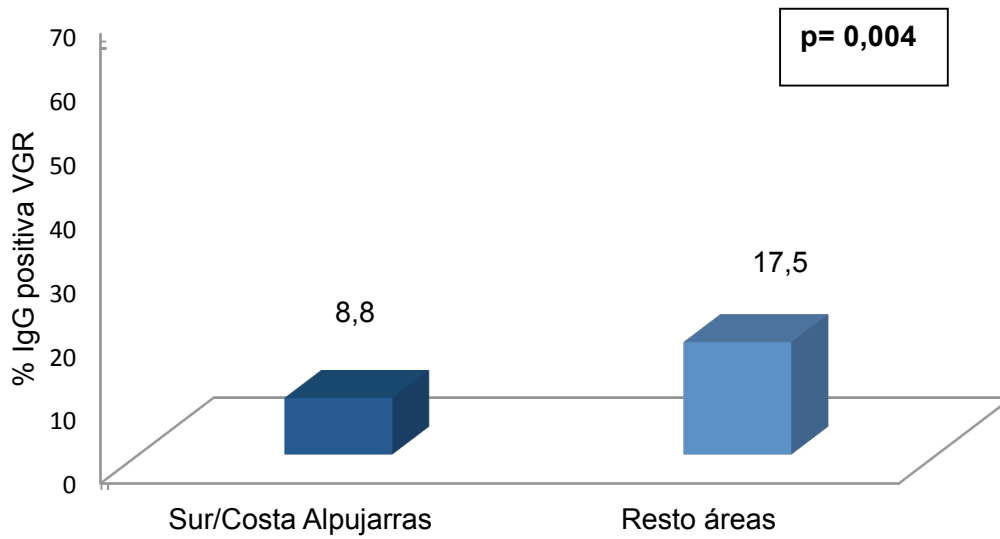


Figura IV.6. Seroprevalencia de IgG anti virus Granada en el área Sur/costa Alpujarras y en el resto de las áreas geográficas de la provincia.

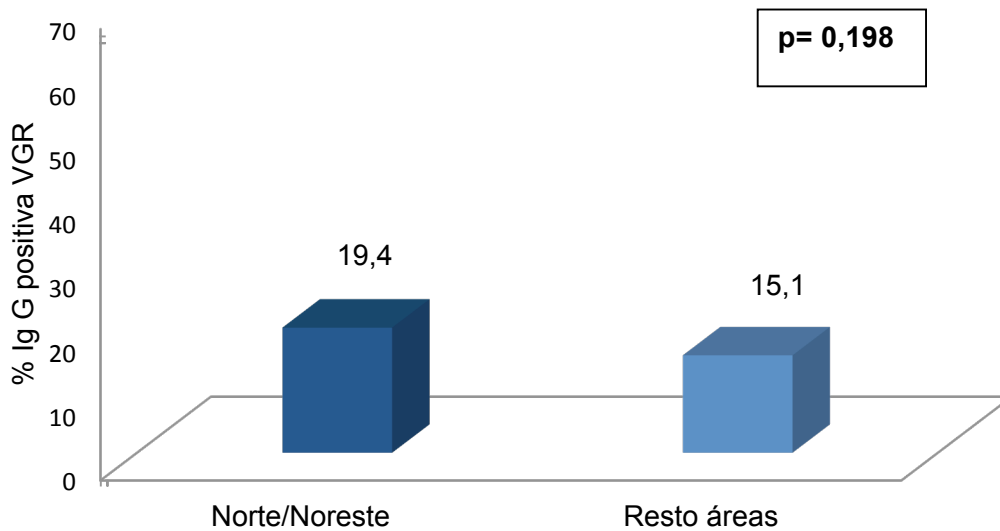


Figura IV.7. Seroprevalencia de IgG anti virus Granada en el área Norte/Noreste y en el resto de las áreas geográficas de la provincia.

La distribución de seroprevalencias de VGR con respecto a la que se obtuvo con VTOS (**Figuras IV.8, IV.9 y IV.10**), muestra bastantes diferencias, ya que con VGR donde mayores tasas se obtienen es en el área Norte/Noreste, mientras que en VTOS esto sucede en el área contraria, Oeste /Suroeste. Por otro lado, en el área sur la seroprevalencia de infección por VGR es baja (8.8%), mientras que la de VTOS se mantiene en torno a la media general (25%).

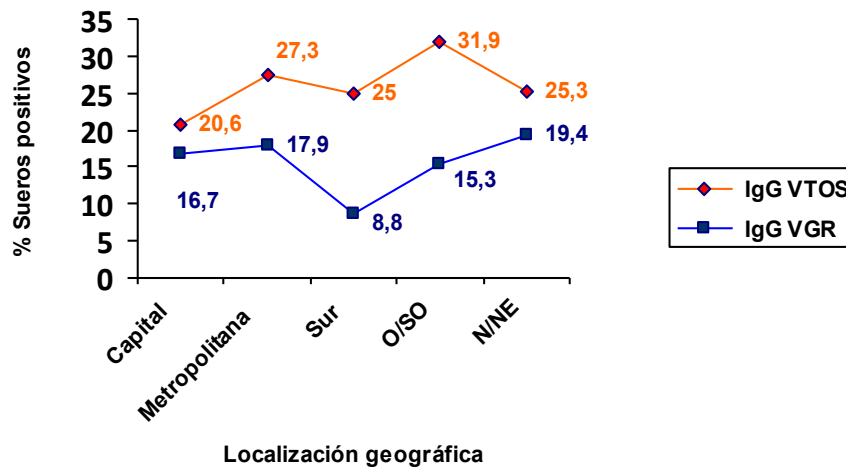


Figura IV.8. Comparación de seroprevalencias de infección por virus Granada y Virus Toscana en la provincia de Granada atendiendo a la localización geográfica

Datos de seroprevalencia de VTOS tomados del trabajo de tesis doctoral de Dra Sara Sanbonmatsu (*Infección neurológica por Virus Toscana en la provincia de Granada: Estudio clínico-epidemiológico, 2005*, con autorización).

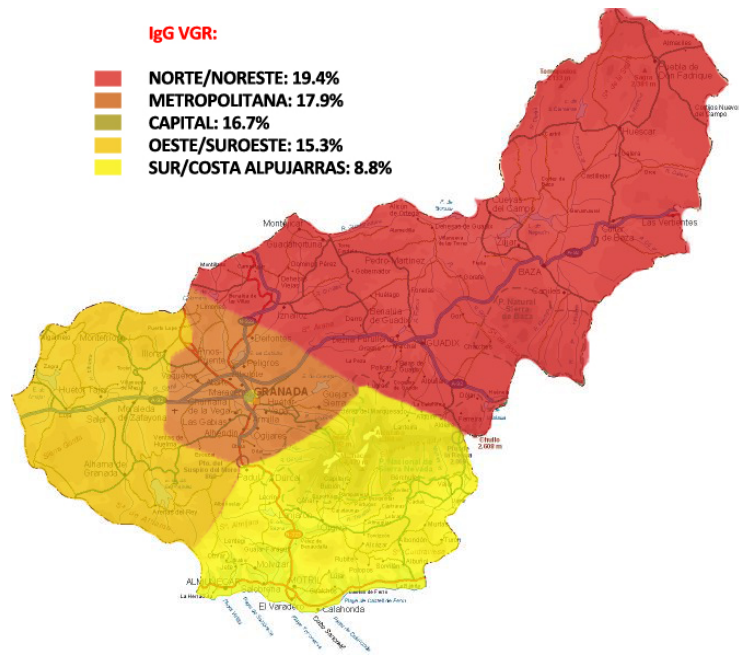


Figura IV.9. Mapa de distribución de seroprevalencias de infección por virus Granada en la provincia de Granada.

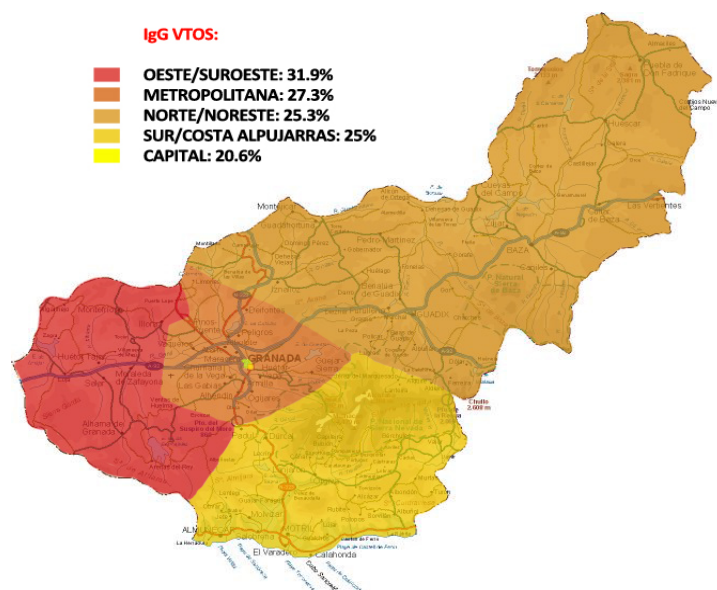


Figura IV.10. Mapa de distribución de seroprevalencias de infección por Virus Toscana en la provincia de Granada

IV.1.2. SEROPREVALENCIA DE INFECCIÓN POR VIRUS GRANADA, RESULTADOS OBTENIDOS UTILIZANDO SERONEUTRALIZACIÓN

Cuando se realizó seroneutralización (SNA) para detección de IgG específica para VGR de los 145 positivos por IFI, resultaron positivos el 17.9% (N=27), lo que supone un 2,8% del total de sueros estudiados.

Debido al bajo número de sueros positivos por SNA, la muestra fue insuficiente para poder realizar un estudio estadístico que permitiera establecer diferencias por edad, sexo o área geográfica.

Al igual que sucede con VGR, en muchos sueros IgG positivos frente a VTOS por ELISA, la SNA ha sido negativa (n=37; 63,8%), e incluso existen sueros con SNA positiva a VTOS que son negativos en la detección de IgG por ELISA (n=7; 25%). (Tabla IV. 3)

Tabla IV.3. Resultados de seroneutralización (SNA) frente a virus Granada y virus Toscana en sueros positivos frente a virus Granada por IFI.

IgG IFI VGR	EIA TOS IgG	SNA-VGR	SNA-VTOS	Nº
+	+	+	+	8
+	+	-	+	11
+	+	+	-	4
+	+	-	-	35
+	-	+	+	3
+	-	-	+	4
+	-	+	-	11
+	-	-	-	69
TOTAL				145

Por lo que en conjunto, la seroprevalencia de infección por VGR en la población general en nuestro medio está entre el 2,8% y el 15,8% según la técnica utilizada (SNA e IFI respectivamente).

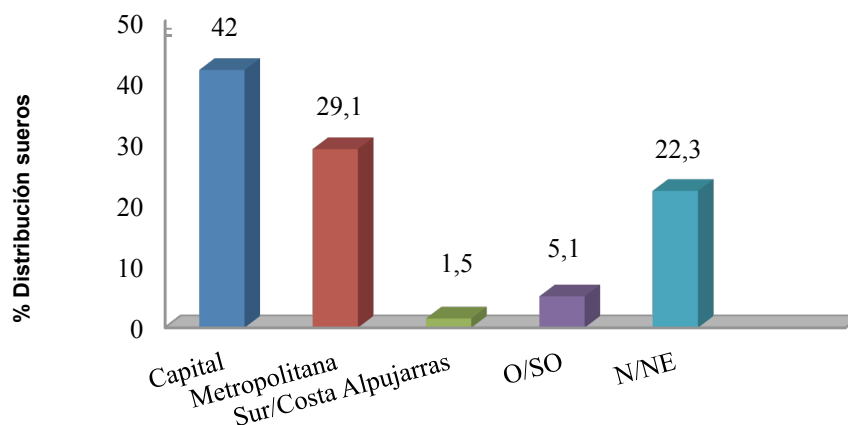
IV.2. ESTUDIO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS GRANADA EN LA PROVINCIA DE GRANADA

En total se estudiaron 547 pacientes, con edades comprendidas entre los 1 y 87 años (mediana=34, media= 35,8), con las siguientes patologías:

- Síndrome febril de menos de 7 días de duración (n= 360)
- Exantema (n= 33)
- Infección respiratoria aguda (n=154).

De ellos, 250 (45.7%) fueron mujeres y 297 (54.3%) varones.

En **Figura IV.11**, se muestra el origen de las muestras estudiadas, atendiendo a la distribución geográfica, estableciendo un paralelismo con las áreas descritas en el estudio de seroprevalencia.



Áreas geográficas	Capital	Metropolitana	Sur/Costa Alpujarras	Norte/ Noreste	Oeste/ Suroeste	
Sueros (n)	230	159	8	122	28	547

Figura IV.11. Origen de las muestras analizadas para estudio de la implicación clínica de virus Granada.

Se detectó IgM positiva frente VGR en 36 de 547 sueros (6,6%), no mostrando diferencias significativas entre los síndromes estudiados ($p= 0,461$) (**Tabla IV.4**). Además para descartar posibles reacciones cruzadas, en todos estos sueros IgM frente a VGR se les determinó la presencia de IgM frente a VTOS, resultando en todos los casos negativa.

Tabla IV.4. Distribución de IgM positiva frente virus Granada en pacientes de la provincia de Granada según los síndromes estudiados.

	IgM positiva frente VGR		Total
	n	%	
Síndrome febril	27	7.5	360
Exantema	2	6,1	33
Infección respiratoria aguda	7	4,5	154
Total	36	6.6	547

Las principales características clínicas y demográficas, de los pacientes con serología IgM positiva frente a VGR se muestran en **tabla IV. 5**.

Tabla IV.5. Características clínicas y demográficas de pacientes IgM positiva frente a virus Granada.

Paciente nº	Síndrome clínico	Edad	Sexo	Área Geográfica
1	Síndrome febril	41	F	CAPITAL
2	Síndrome febril	25	F	NORTE/NORESTE
3	Síndrome febril	30	F	CAPITAL
4	Síndrome febril	61	M	METROPOLITANA
5	Síndrome febril	9	M	SUR/COSTA ALPUJARRAS
6	Síndrome febril	39	M	METROPOLITANA
7	Síndrome febril	37	F	METROPOLITANA
8	Síndrome febril	4	F	NORTE/NORESTE
9	Síndrome febril	9	F	METROPOLITANA
10	Síndrome febril	48	F	CAPITAL
11	Síndrome febril	34	M	NORTE/NORESTE
12	Infección respiratoria aguda	15	F	NORTE/NORESTE
13	Exantema	81	F	NORTE/NORESTE
14	Síndrome febril	39	M	METROPOLITANA
15	Exantema	49	F	CAPITAL
16	Infección respiratoria aguda	66	F	NORTE/NORESTE
17	Síndrome febril	24	F	CAPITAL
18	Infección respiratoria aguda	22	M	CAPITAL
19	Infección respiratoria aguda	12	F	CAPITAL
20	Infección respiratoria aguda	8	F	CAPITAL
21	Infección respiratoria aguda	13	M	NORTE/NORESTE
22	Infección respiratoria aguda	87	F	NORTE/NORESTE
23	Síndrome febril	28	F	CAPITAL
24	Síndrome febril	71	F	CAPITAL
25	Síndrome febril	22	M	METROPOLITANA
26	Síndrome febril	62	M	METROPOLITANA
27	Síndrome febril	5	M	METROPOLITANA
28	Síndrome febril	2	F	METROPOLITANA
29	Síndrome febril	14	F	METROPOLITANA
30	Síndrome febril	27	M	CAPITAL
31	Síndrome febril	23	M	NORTE/NORESTE
32	Síndrome febril	63	M	SUR/COSTA ALPUJARRAS
33	Síndrome febril	45	M	CAPITAL
34	Síndrome febril	23	M	CAPITAL
35	Síndrome febril	75	F	NORTE/NORESTE
36	Síndrome febril	25	M	METROPOLITANA

Los 36 sueros en los que se detecta IgM frente a VGR se distribuyen de la siguiente manera en cuanto a las áreas geográficas: 13 casos (36,1%) en la capital, 11 casos (30,5%) en el área metropolitana, 2 casos (5,5%) en el área sur/costa Alpujarras, 10 casos (27,7%) en el área norte/noreste y ningún caso en el área oeste/suroeste. (Figura IV.12)

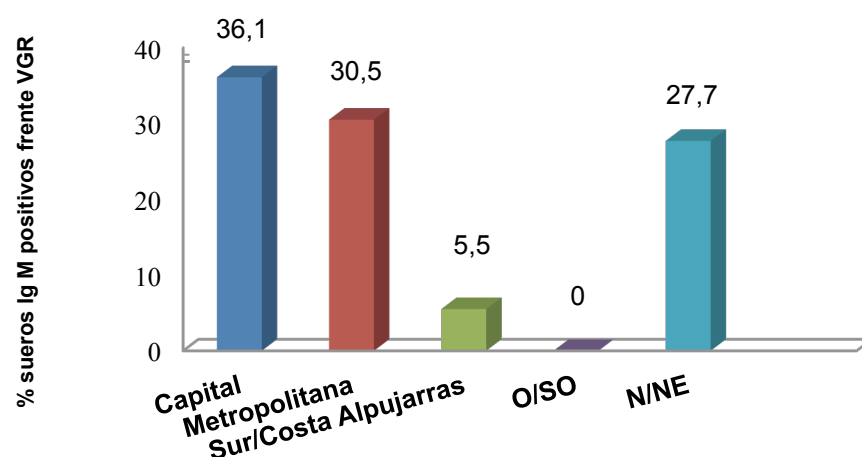
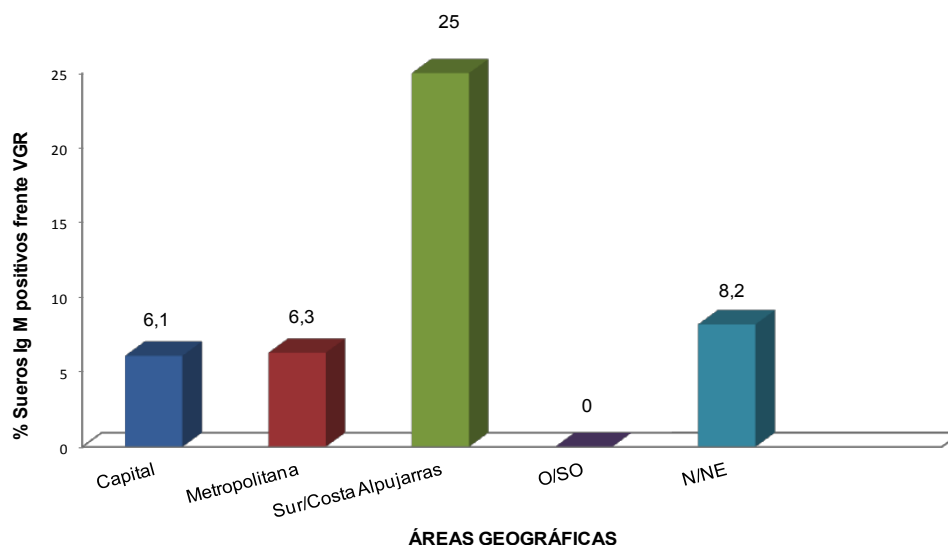


Figura IV.12. Distribución del total de sueros con IgM positiva frente a Virus Granada atendiendo a las áreas geográficas.

Si se realiza el análisis atendiendo a la tasa de positivos sobre el número de muestras estudiadas en cada una de las distintas áreas, el mayor porcentaje se obtiene en el área sur (25%), seguido del área norte/noroeste; pero dado el escaso número de muestras analizadas de la zona sur, no permitió realizar análisis estadístico, para valorar estas diferencias (Figura IV.13). No obstante, si se consideran aquellas áreas con número de sueros estudiados superior a 25, se puede observar que entre la capital, y las áreas metropolitana, oeste/suroeste y norte/noreste no existen diferencias significativas ($p= 0.450$).



Área geográfica		Capital	Metropolitana	Sur/Costa Alpujarras	Oeste/Suroeste	Norte/Noreste
Sueros	Estudiados (n)	230	159	8	28	122
	IgM+ (n)	14	10	2	0	10

Figura IV.13. Distribución de sueros con IgM positiva frente a Virus Granada atendiendo al número de muestras estudiadas de cada una de las áreas geográficas.

La distribución por edades de los sueros IgM positivos se muestra en **Figura IV.14**. Sobre el total de sueros positivos el mayor porcentaje se detectó en la franja de edad entre 16-40 años, y el menor porcentaje en los mayores de 65 años. Para analizar si existen diferencias significativas se estudiaron los sueros con resultados positivos, sobre el total de sueros estudiados en cada una de las franjas de edad, no existiendo diferencias significativas ($p= 0,819$). (**Figura IV.15**).

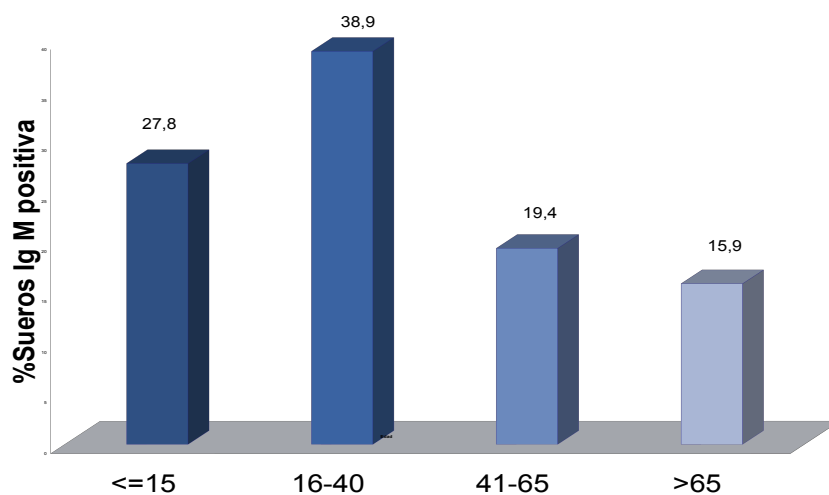


Figura IV.14. Distribución del total de sueros con IgM positiva frente a Virus Granada atendiendo a la edad.

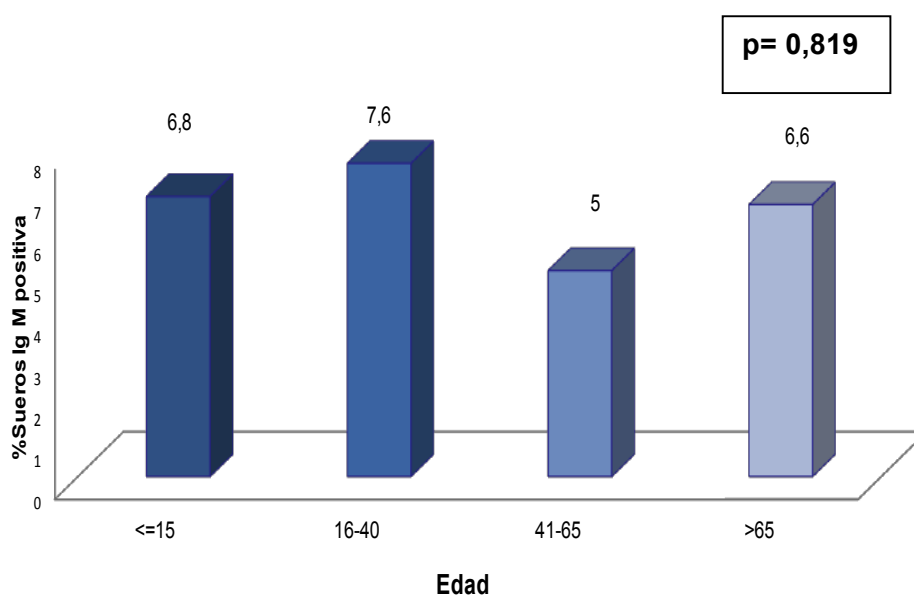


Figura IV.15. Distribución de sueros con IgM positiva frente a Virus Granada atendiendo al número de muestras estudiadas de cada una de las edades.

No se observan diferencias significativas cuando se estudia la distribución por sexos ($p= 0.220$). (Figura IV.16).

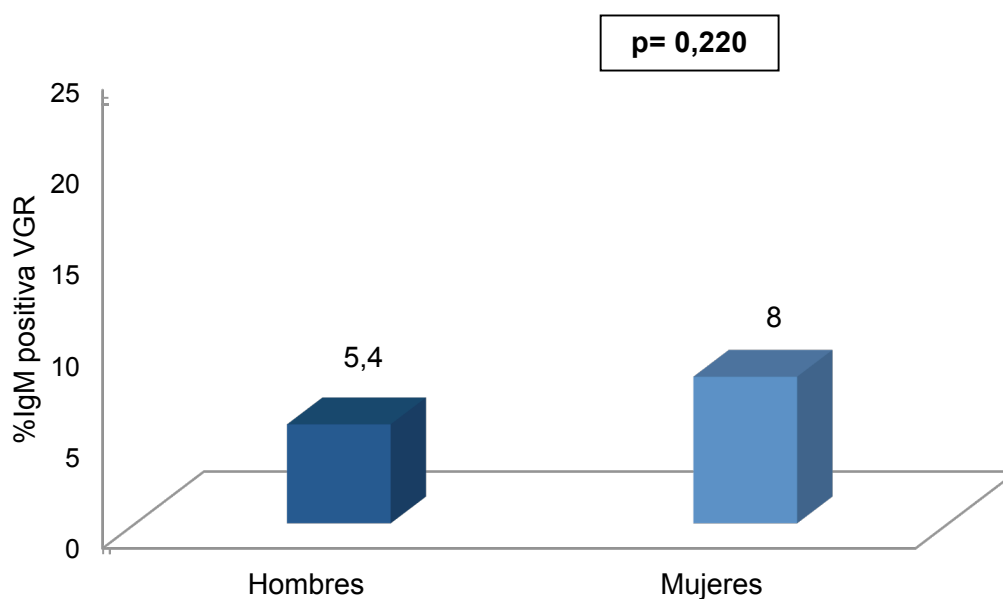
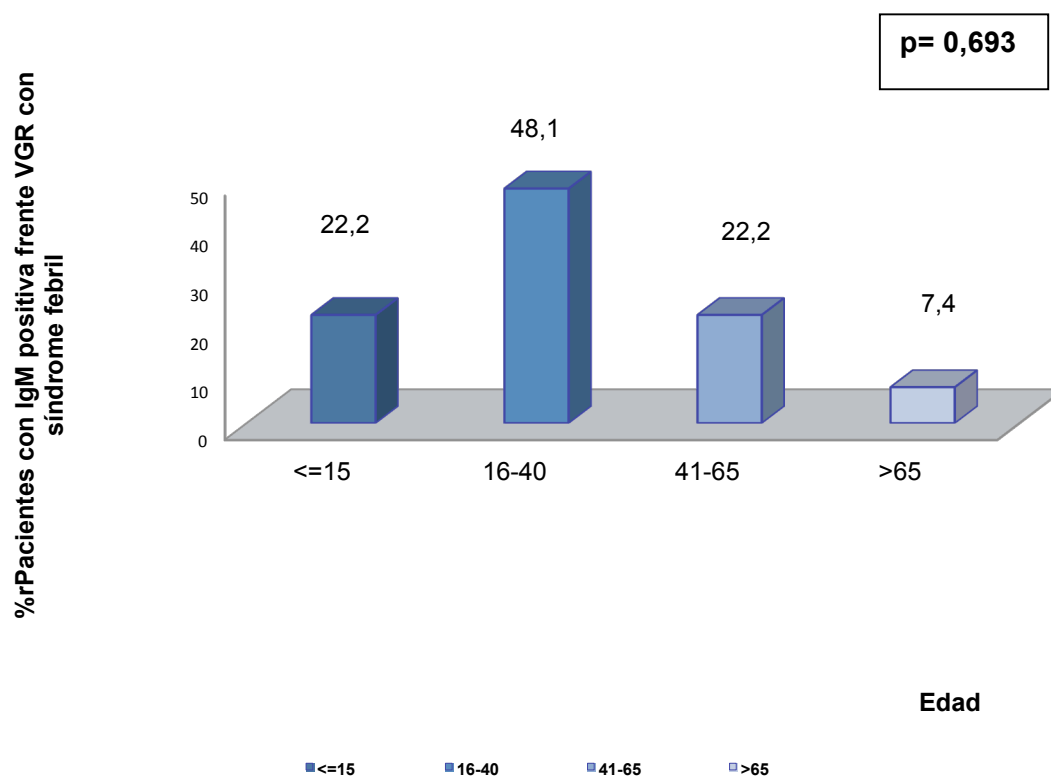


Figura IV.16. Distribución de sueros con IgM positiva frente a Virus Granada atendiendo al sexo.

Los dos casos de exantema encontrados se dieron en mujeres de 81 y 49 años procedentes del área norte/noreste y de la capital respectivamente.

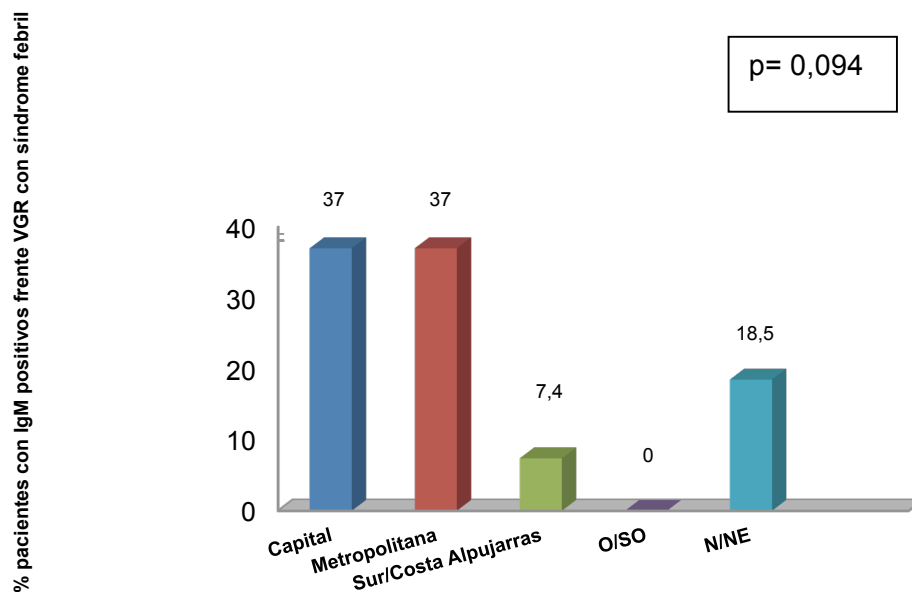
Con respecto a los 7 casos de infección respiratoria aguda, 5 mujeres y 2 hombres, la edad estuvo comprendida entre los 8 y los 87 años y también como en el caso anterior sólo se detectaron en el área norte/noreste y en la capital (3 y 4 casos respectivamente).

En los 27 casos de síndrome febril, la distribución por edades y por áreas geográficas puede observarse en las figuras **(Figura IV.17)** y **(Figura IV.18)** respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre en la distribución por edades ($p=0,693$), pero sí en el caso de la distribución por áreas geográficas ($p=0,094$), donde la mayor tasa se da en las áreas capital y metropolitana (37% en las 2 localizaciones) frente al resto.



Edad	<=15	16-40	41-65	>65
Pacientes con IgM + VGR con SF (n)	6	13	6	2
%	22,2	48,1	22,2	7,4

Figura IV.17. Distribución de pacientes con IgM positiva frente a Virus Granada y con síndrome febril atendiendo a las edades.



Áreas geográficas	Capital	Metropolitana	Sur/Costa Alpujarras	Oeste/Suroeste	Norte/Noreste
Pacientes con IgM + VGR con SF (n)	10	10	2	0	5
%	37	37	7,4	0	18,5

Figura IV.18. Distribución de pacientes con IgM positiva frente a Virus Granada y con síndrome febril atendiendo a las áreas geográficas.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Nuestro grupo, como parte del trabajo desarrollado en la Red Cooperativa EVITAR (Enfermedades víricas transmitidas por artrópodos y roedores), patrocinada por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), aisló en flebotomos de la provincia de Granada, aparte de VTOS, otros 2 flebovirus diferentes que se denominaron Granada 25 (VGR25) y Granada 82 (VGR82), atendiendo a los lotes de flebotomos de los que fueron detectados. Posteriormente el VGR25 ha pasado a denominarse “virus Granada” (VGR). Los análisis filogenéticos llevados a cabo muestran que VGR se agrupa en un mismo serocomplejo con virus Nápoles (SFVN) y VTOS, y con el recientemente descrito en el sur de Francia, virus Massilia (Palacios y cols, 2013b). El SFVN es patógeno frecuente en algunos países del área Mediterránea como causante de síndromes febriles hasta la década de los setenta (Fiebre Papatacci).

En este trabajo, se presenta el primer estudio poblacional amplio que estudia la seroprevalencia de infección por VGR en población humana asintomática, así como su capacidad para infectar y ser responsable de patología infecciosa en humanos.

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

V.1.1 ANÁLISIS GLOBAL

En nuestro estudio, la seroprevalencia de la infección por Virus Granada (VGR) en la población general de Granada muestra tasas que varían según se utilice seroneutralización (SNA) o inmunofluorescencia indirecta (IFI) desde el 2,8% al 15,8% respectivamente. Aunque en principio la SNA es una técnica más específica, a su vez es mucho menos sensible, por lo que cabe la posibilidad de que existan falsos negativos; todo lo contrario sucede con la IFI,

mucho más sensible, pero menos específica, por lo que podemos encontrar falsos positivos. Por tanto, si bien los ensayos de SNA son los más específicos, su negatividad no excluye infección; por lo que los resultados positivos de IFI no necesariamente debemos considerarlos falsos positivos. Así pues, probablemente la seroprevalencia no sea ni tan baja como la obtenida por SNA, ni tan alta como se observa con IFI.

De hecho, si se observan los resultados serológicos que se obtienen frente a VTOS, en los pacientes positivos para VGR, muchos de los positivos para VTOS por ELISA son también SNA negativa a VTOS, a pesar de que la técnica de ELISA utiliza antígenos recombinantes específicos de VTOS; incluso se observan algunos sueros con SNA positiva para VTOS en los que la prueba de ELISA es negativa. Dentro de nuestra experiencia clínica se constata, que en una de nuestras pacientes con meningitis en la que se aisló TOS en LCR, la IgM e IgG fueron positiva y sin embargo el ensayo de SNA fue negativo. (Sanbonmatsu, comunicación personal)

Esta falta de concordancia entre pruebas serológicas para flebovirus ha sido recientemente señalada y discutida por algunos autores (Ergünay y cols, 2011). En estos casos se plantea utilizar otras técnicas alternativas, que utilicen antígenos más específicos como inmunoblot (IB), con la que los resultados obtenidos pueden acercarse más a la realidad, por lo que en un futuro nos proponemos poner a punto una técnica de IB, que nos permita ser más objetivos en este apartado.

Nuestros datos, reproducen los resultados previos publicados, con una muestra de nuestra colección de sueros (Collao y cols, 2010). Donde en ellos se obtuvo una seroprevalencia por IFI del 14.9% (37 de las 248 muestras). 5 de ellos además mostraron SNA positiva para VGR. 4 de ellos fueron IgG VTOS positiva por ELISA o IFI pero solo uno tuvo la SNA positiva para VTOS.

El 40% de los sueros con IFI positivos para VGR, presentaron también IgG frente a VTOS. Si bien, este hecho puede deberse a reacciones cruzadas

entre flebovirus, también cabe la posibilidad de que se trate de personas que por su hábitat, ámbito profesional, etc, puedan estar expuestas de forma repetida a picaduras de flebotomos y por tanto a riesgo de adquirir, en distintas fases de su vida, infección por ambos virus. En un estudio reciente, se ha estudiado la relación entre seroprevalencias de infección por VTOS y *Leishmania infantum*, (Bichaud L y cols, 2011) que comparten el mismo vector, *Phlebotomus perniciosus*, pero con poca comunidad antigénica que haga suponer la existencia de reacciones cruzadas; y los resultados obtenidos entre VTOS vs *Leishmania*, son muy similares a los obtenidos con VGR vs VTOS. En su trabajo demuestra que el 51% de las personas con IgG positiva a VTOS poseen también IgG frente a *Leishmania* y el 48% de los que tienen IgG a *Leishmania* positiva también tienen IgG frente VTOS.

Además, si el alto porcentaje de sueros positivos a ambos virus, se debiera exclusivamente a reacciones cruzadas, este porcentaje debería mantenerse entre los distintos grupos de edad, y sin embargo es muy superior en mayores de 65 años (hasta un 70% de los positivos de VGR son también positivos a VTOS), que en los menores de esta edad (25%).

V.1.2.SEROPREVALENCIA DE VIRUS GRANADA ATENDIENDO A LA EDAD

La seroprevalencia a VGR aumenta de forma significativa con la edad, hasta los 65 años y a partir de esta edad, decrece, al contrario de lo que sucede con VTOS, donde las mayores tasas de positivos se dan en mayores de esta edad (60% frente a la tasa media global del 25%) (Sanbonmatsu y cols, 2005).

Este hallazgo, en general, podría ser explicado por la mayor probabilidad de exposición al vector a la largo de la vida; pero, curiosamente con VGR se observa una disminución de prevalencia en mayores de 65 años, lo que podría deberse a que el virus sea de introducción reciente en nuestro hábitat o bien, ha aumentado su presencia por algún cambio ecológico, desde mediados del

siglo pasado, por lo que las personas actualmente mayores de 60 años, en su juventud, cuando más posibilidades de exposición al vector existen, no contaban con este virus en el medio para poder infectarse.

V.1.3 SEROPREVALENCIA DE VIRUS GRANADA ATENDIENDO A LAS DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS DE LA PROVINCIA DE GRANADA

Tras comparar los resultados obtenidos en este trabajo, con los previos existente con VTOS observamos una diferente distribución de seroprevalencias entre VGR y VTOS atendiendo a las distintas áreas geográficas en las que se dividió la provincia de Granada para la realización del estudio.

Las mayores tasas de seroprevalencia para VGR se dan en el área Norte/Noreste (19,4%), justo en el área donde se capturaron los lotes de flebotomos durante los años 2003 y 2004 en los que se detectó VGR mediante cultivo celular y RT-PCR (Sanbonmatsu, 2005); mientras que para VTOS esto sucede en el área contraria de la provincia, Oeste/Suroeste (31,9%).

Por otro lado, en el área Sur/Costa Alpujarras la seroprevalencia por VGR es baja (8,8%) mientras que la de VTOS se mantiene en torno a la media general (25%).

Estos datos, como en el caso comentado de la edad, pueden ir también en la dirección del distinto tiempo de presencia en nuestro medio de ambos virus. Probablemente la introducción de VTOS sea más antigua, lo que facilita el que se haya distribuido de forma homogénea, encontrándose sin diferencias notables en toda la provincia, mientras que VGR de introducción más reciente, aún no se ha afincado suficientemente en el área sur/costa, probablemente por la barrera que supone las estribación montañosa de Sierra Nevada, en el ciclo evolutivo en hábitat cerrados de los flebotomos; ya que las colonias de flebotomos suelen permanecer separadas, porque éstos se mueven en saltos cortos, volando como máximo algunos cientos de metros desde sus sitios de descanso (Pesson y cols, 2004).

El VGR se ha aislado también a partir de flebotomos en otras regiones de España como Baleares y Cataluña, por lo que como en el caso de VTOS, y al igual que sucede en Francia con Virus Massilia, en España las prevalencias más altas deben estar relacionadas con la distribución de los flebotomos, por lo que sería interesante ampliar los estudios de seroprevalencia de VGR a otras zonas, fundamentalmente del área mediterránea.

Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio que investigue la presencia de VGR fuera de humanos o sus vectores, por lo que desconocemos si puede existir algún reservorio animal, doméstico o salvaje, que preserve el virus en los meses fríos en los que no circulan los vectores favoreciendo su persistencia en nuestro medio.

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

La infección humana por virus transmitidos por picadura de flebotomos es conocida desde la década de los cuarenta (Beaty y Calisher, 1991) tratándose en general, y si exceptuamos la infección por VTOS, de procesos febriles de comienzo agudo, autolimitados y con una duración aproximada de tres a cinco días. Hasta la fecha, en el área mediterránea, dos han sido los serotipos de *Phlebovirus* que más frecuentemente se han asociado a estos cuadros: SFNV y SFS.

El análisis filogenético realizado con VGR (Collao y cols, 2010) muestra parentesco con SFVN, incluyéndose en el mismo serocomplejo.

La caracterización genómica y antigénica de los miembros del complejo Nápoles (SFNV) revela la presencia de cinco clados: virus Saint Floris y virus Gordil, en África, forman un clado; virus Punique, virus Granada y virus Massilia pertenece a un segundo clado y se han aislado en la zona del Mediterráneo occidental; virus Toscana forma un tercero; Virus Nápoles se engloba dentro de

un cuarto clado; y virus Tehran y un aislado serbio Yu 8/76, representan el quinto clado. El único virus dentro del complejo SFNV que ha intercambiado segmentos genéticos es Virus Granada, a diferencia de lo que ocurre con otros flebovirus en Sudamérica, donde la frecuencia de reagrupamientos “reassortment” es alta (Palacios y cols, 2014).

La mayor circulación de flebotomos en nuestro medio se produce en los meses cálidos (Morillas Márquez y cols, 1983; Gil Collado y cols, 1989; Morillas Márquez y cols, 1991), y es en estos periodos cuando mayor riesgo de infección por *Phlebotomus* existe.

En base a lo expuesto anteriormente, para nuestro estudio seleccionamos a pacientes atendidos en Atención Primaria de nuestra Área sanitaria que presentaran durante los meses de mayo a octubre, patologías similares a las que se sabe que produce SFVN en regiones donde se distribuye: cuadros febriles autolimitados, exantemas e infección respiratoria aguda (IRA) y con resultados negativos para otros patógenos. No incluimos procesos neurológicos, porque en nuestra experiencia como Laboratorio Regional de Referencia en Andalucía, desde hace 4 años, en 457 muestra de LCR, en las que aplicamos de forma sistemática una PCR genérica de flebovirus (Sánchez Seco y cols, 2003) y en ningún caso se ha detectado VGR (Datos no mostrados).

Para el estudio clínico la población no se estratificó previamente con la idea de realizar un estudio epidemiológico; por tanto las poblaciones no son homogéneas en cuanto a número, sexo, localización geográfica, etc.

Se estudiaron 547 pacientes de los cuales se detectó IgM positiva frente a VGR en 36 (6,6%). Para descartar posibles reacciones cruzadas con otros virus relacionados, se determinó la presencia de IgM frente a VTOS, resultando en todos ellos negativa.

Atendiendo a las patologías estudiadas el 7,5% de los pacientes con síndrome febril fueron positivos, seguidos del 6,1% de los exantemas y del 4,5% de las infecciones respiratorias.

En un estudio similar realizado previamente con VTOS, sólo se detectó IgM positiva en un paciente con exantema, y en ningún otro caso con patología no neurológica. (Sanbonmatsu y cols, 2009).

El alto porcentaje de casos febriles y con exantema, con IgM frente a VGR positiva, indica que muy probablemente VGR tenga un comportamiento clínico similar en nuestro medio al de SFVN en Italia (síndromes febriles (Fiebre Papatacci), y por tanto cabe recomendar estudiar su presencia en estos procesos en periodo estival, sobre todo cuando se han descartado otros posibles agentes etiológicos más habituales.

El mayor porcentaje de positivos sobre el número de muestras estudiadas en cada una de las distintas áreas geográficas, se da en el área sur (25%) seguido del área norte/noroeste; no obstante, dado el escaso número de pacientes, no permite la realización de ningún análisis estadístico.

En cuanto a la edad, el mayor porcentaje de resultados positivos se dio en el rango de edades de 16 a 40 años (38,9%) y el menor porcentaje en los mayores de 65 años (13,9%). Estos datos coinciden con los observados en los pacientes con manifestaciones clínicas por VTOS (Navarro y cols, 2004). Pero tampoco en este caso el análisis estadístico mostró diferencias significativas, ya que también el mayor porcentaje de muestras recibidas también correspondió al grupo de entre 16 y 40 años.

En conjunto, por los resultados obtenidos en el presente trabajo se deduce que VGR infecta a humanos en nuestro medio, generalmente de forma asintomática o paucisintomática, pero que ocasionalmente puede provocar algún proceso clínico autolimitado benigno, del tipo de cuadros febriles o exantemas, como ya sucede con otros virus del mismo grupo en otros países

mediterráneos, y por tanto cabe contemplar la necesidad de incluirlo entre los agentes responsables de dichas patologías, sobre todo durante los meses de verano.

Si a esto se le suma que normalmente se trata de pacientes no hospitalizados, que padecen enfermedad autolimitada, y que por tanto no suelen ser estudiados desde el punto de vista del diagnóstico etiológico por el laboratorio, existe la posibilidad de que pueda subestimarse la incidencia real de infección por VGR.

En la actualidad, sólo existen técnicas comerciales de diagnóstico serológico estandarizadas para VTOS. No obstante, cuando se han comparado estas técnicas: inmunoenzimáticas, inmunofluorescencia, westernblot o seroneutralización, la concordancia ente las mismas es muy baja, lo que sugiere que en el diagnóstico serológico de VTOS y probablemente de otros flebovirus menos estudiados es manifiestamente mejorable (Ergünay y cols, 2011).

Con respecto a VGR, al ser un virus de conocimiento reciente, no existe ningún procedimiento de diagnóstico accesible a la mayoría de laboratorios clínicos, como podría ser, en este caso, una técnica serológica de detección de IgM, para ser utilizado de rutina en los cuadros en que se sospeche su implicación y desconocemos que antígeno sería el más adecuado para usar en el desarrollo de futuras técnicas.

Por ello, como continuación de este trabajo nos proponemos desarrollar una técnica de diagnóstico serológico para virus Granada, a partir de seleccionar los antígenos y técnicas más adecuadas para su uso en rutina

En España, se han detectado flebotomos en la mayoría de las Comunidades Autónomas (Gil Collado y cols, 1989; Gallego Berenguer y cols, 1992). Por tanto, sería recomendable realizar más estudios para establecer la implicación real de VGR en cuadros infecciosos no neurológicos en otras áreas

geográficas de nuestro país. Así mismo también, como sucede con otros flebovirus es posible que la incidencia de enfermedad sea mucho mayor en población de zonas no endémicas que visitan áreas endémicas, por lo que habría que contemplar esta posibilidad también en los viajeros que nos visitan en época estival, si sufren cuadros similares tras retornar a su lugar de origen.

Los Estudios de seroprevalencia de VTOS llevados a cabo dentro del subproyecto Toscana de la Red EVITAR en la provincia de Granada mostraron una tasa de infección muy alta (21% en el conjunto de la población general y cercana al 60% en la población mayor de 65 años), lo que contrasta con el aparentemente bajo número de infecciones que tienen traducción clínica, a diferencia de lo que ocurre en otros países como Italia, con seroprevalencias similares, donde se detectan un mayor porcentaje de casos clínicos. Este hecho puede ser debido a que la variante española de VTOS, sea menos virulenta que la Italiana, o bien a que existan otros virus filogenéticamente cercanos, menos virulentos, que de alguna manera puedan provocar en la población general respuestas inmunes que protejan a su vez de la infección grave por VTOS.

En este sentido, cabe especular que VGR, más frecuente en flebotomos que VTOS, pueda tras infectar a humanos, actuar en este sentido, provocando una respuesta inmune, que proteja parcialmente frente al desarrollo de cuadros neurológicos tras la infección por VTOS, como parece que está sucediendo en Europa en el caso de virus West Nile (VWN); ya que se han descrito flavivirus, emparentados con VWN, pero menos virulentos, a los que están expuestos la población general, y que pueden en gran medida condicionar que en gran parte de Europa la infección por VWN se limite a casos puntuales, a diferencia de lo que sucede en otras áreas geográficas, donde puede llegar a ocasionar verdaderas epidemias (Sanchez Seco y Navarro, 2005).

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La seroprevalencia de la infección por virus Granada en la población general de Granada muestra tasas que varían, desde el 2,8% al 15,8%, según se utilice seroneutralización o inmunofluorescencia indirecta respectivamente.
2. La seroprevalencia a virus Granada aumenta de forma significativa con la edad, hasta los 65 años y a partir de esta edad, decrece, al contrario de lo que sucede con virus Toscana.
3. En la provincia de Granada las mayores tasas de seroprevalencia para virus Granada se dan en el área Norte/Noreste mientras que para virus Toscana esto sucede en el área Oeste/Suroeste.
4. La seroprevalencia por virus Granada es baja en el área Sur/Costa Alpujarras mientras que para virus Toscana se mantiene en torno a la media general.
5. Virus Granada infecta a humanos en nuestro medio, generalmente en forma asintomática, pero ocasionalmente puede producir cuadros febriles o exantemáticos, sobre todo durante los meses de verano.
6. Sería recomendable estudiar la presencia de virus Granada durante el periodo estival en casos febriles y con exantema cuando se han descartado otros agentes etiológicos.
7. Serían necesarios más estudios para constatar si virus Granada podría provocar en la población general respuestas inmunes que protejan a su vez de la infección grave por virus Toscana.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Alkan C, Bichaud L, de Lamballerie X, Alten B, Gould EA, Charrel RN. Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Res* 2013; 100: 54-74.

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 meningoencephalitis. *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.

Bartels S, de Boni L, Kretzschmar HA, Heckmann JG. Lethal encephalitis caused by the Toscana virus in an elderly patient. *J Neurol* 2012; 259: 175-177.

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

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

Bichaud L, Souris M, Mary C, Ninove L, Thirion L, Piarroux RP, et al. Epidemiologic relationship between Toscana virus infection and *Leishmania*

infantum due to common exposure to *phlebotomus perniciosus* sandfly vector. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5: e1328.

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.

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

Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. En: 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.

Cardeñosa N, Kaptoul D, Fernández-Viladrich P, Aranda C, de Ory F, Niubó J, Plans P, Domínguez A, Fedele G, Tenorio A, Sánchez- Seco MP. Toscana virus infection in Catalonia (Spain). Vector Borne Zoonotic Dis 2013; 13: 273-275.

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.

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

Charrel RN, Moureau G, Temmam S, Izri A, Marty P, Parola P, da Rosa AT, Tesh RB, de Lamballerie X. Massilia virus, a novel Phlebovirus (Bunyaviridae) isolated from sandflies in the Mediterranean. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009; 9: 519-530.

Collao X, Palacios G, Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, Negrodo AI, Navarro-Marí JM, Grandadam M, Aransay AM, Lipkin WI, Tenorio A, Sánchez-Seco MP. Genetic diversity of Toscana virus. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 574-577.

Collao X, Palacios G, de Ory F, Sanbonmatsu S, Pérez-Ruiz M, Navarro JM, Molina R, Hutchison SK, Lipkin WI, Tenorio A, Sánchez-Seco MP. Granada virus: a natural reassortant of Sandfly Fever Naples serocomplex with low seroprevalence in humans. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 83: 760-765.

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.

Bibliografía

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 Ory-Manchón F., Sanz-Moreno J.C, Aranguéz-Ruiz E. Ramírez-Fernández R. Seroprevalencia edad dependiente frente al virus Toscana en la Comunidad de Madrid: años 1993-1994 y 1999-2000. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 187-189.

Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C. Arthropod-borne viruses transmitted by phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill* 2010; 15: 19507.

Diallo M, Nabeth P, Ba K, Sall A, Ba Y, Mondo M, Girault L, Obdalahi M, Mathiot C. Mosquito vectors of the 1998-1999 outbreak of Rift Valley Fever and other arboviruses (Bagaza, Sanar, Wesselsbron and West Nile). *Med Vet Entomol* 2005;19:119-126.

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

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

Domínguez A, Cardeñosa N, Carmona G, Barrabeig I, Camps N, Minguell S, Tenorio A, Salleras L. Epidemiología y vacunas frente a las arbovirosis. *Vacunas* 2003; 4: 86-94.

Echevarría JM, de Ory F, Guisasola ME, Sánchez-Seco MP, Tenorio A, Lozano A, Córdoba J, Gobernado M. 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.

Elliott R. M. Schmaljohn C., M. Collet. Bunyaviridae genome structure and gene expression. *Current Top Microbiol Immunol* 1991; 169: 91-141.

Elliott R. M. Bunyaviruses and climate change. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 510-517.

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

Ergünay K, Litzba N, Lo MM, Aydogan S, Saygan MB, Us D, et al. Performance of various commercial assays for the detection of Toscana virus antibodies. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11:781-787.

Fauquet C.M, Mayo M., Maniloff J. Desselberger U., L. Ball. Virus Taxonomy Eight report of the International Committee on Taxonomy. Virology division

Bibliografía

international union of Microbiological societies, 2005. Elsevier Academic press, San Diego, CA.

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

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

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

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. p: 917-962.

Grist N.R., Ross C. A., Bell, E. J. Diagnostic Methods in Clinical Virology. 2nd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1974.

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

Hollidge BS, González-Scarano F, Soldan SS. Arboviral encephalitides: transmission, emergence and pathogenesis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010; 5: 428-442.

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

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

IEA. Instituto de Estadística de Andalucía. Censos de población y viviendas 2001-Provincia de Granada (Granada). Obtenido de: URL: <http://www.iea.junta-andalucia.es/censo2001/fichas/fichas/cs18000.htm>

INE. Instituto Nacional de Estadística. Cifras de población referidas al 1/1/02. Población de municipios por sexo. 18 Granada. Obtenido de: URL: <http://www.ine.es/pob02/02muni18.htm>

Karabatsos N. International catalogue of arbovirus, including certain other viruses of vertebrates. *Am Soc Trop Med Hyg* 1985. p. 673-674. 3rd ed. (San Antonio, TX, USA).

Lewis DJ. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae). Bull Br Mus Nat Hist (Entomol) 1982; 45: 121-209.

Leyes M, Ruiz de Gopegui E, Ribas MA, Penaranda M. Presence of the Toscana virus in Majorca. Prevalence and epidemiological characteristics in a hospital population. Enferm Infect Microbiol Clin 2011; 29: 315-316.

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: 661-670.

Liu Y, Huang XY, Du YH, Wang HF, Xu BL. Survey on ticks and detection of new bunyavirus in some vekt in the endemic areas of fever, thrombocytopenia and leukopenia síndrome (FTLS) in Henan province. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 2012; 46: 500-504.

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.

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

Mariott A, Ward V, Nutall P. The S RNA segment of sandfly fever Sicilian virus: evidence for an ambisense genome. Virology 1989; 169: 341-345.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol* 2013; 27: 123-147.

Martínez-García FA, Moreno-Docon A, Lopez-Lopez M, Albert-Lacal L, Martínez-Toldos MC, Segovia-Hernández M, Fernández-Barreiro A. A case of meningitis due to Toscana in Murcia. *Rev Neurol* 2007; 45: 317-318.

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.

Mertz G. J. Bunyaviridae: bunyavirus, phlebovirus, nairovirus and hantavirus. En *Clinical Virology*, Richman D.D; Whitley R. J and Hayden F. G., eds., Churchill-livingstone, New York, 1997. p: 943-972.

Molina R, Miró G, Gálvez R, Nieto J, Descalzo MA. Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *Vet Rec* 2006; 159: 206-209.

Bibliografía

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

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

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

Navarro JM, Fernández-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.

Navarro-Marí JM, Palop-Borrás B, Pérez-Ruiz M, Sanbonmatsu-Gámez S. Serosurvey study of Toscana virus in domestic animals, Granada Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 583-587.

NCBI TAXONOMY 2012 (<http://ecat-dev-gbif.org>)

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, Paci P, Leoncini F, Padovani P, Traini E, Baldereski M, Balducci M. 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.

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.

Palacios G, Savji N, Travassos da Rosa A, Guzman H, Yu X, Desai A, Rosen GE, Hutchison S, Lipkin WI, Tesh R. Characterization of the Uukuniemi virus group (Phlebovirus: Bunyaviridae): evidence for seven distinct species. *J Virol* 2013a; 87: 3187-3195.

Palacios G, Tesh R, Savji N, Travassos da Rosa AP, Guzman H, Bussetti AV, Desai A, Ladner J, Sanchez-Seco M, Lipkin WI. Characterization of the Sandfly fever Naples species complex and description of a new Karimabad species complex (genus Phlebovirus, family Bunyaviridae). *J Gen Virol* 2014; 95: 292-300.

Pérez-Ruiz M, Collao X, Navarro-Marí JM, Tenorio A. Reverse transcription 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.

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.

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

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.

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. Infección neurológica por Virus Toscana en la provincia de Granada: estudio clínico-epidemiológico. [tesis]. Granada: Universidad de Granada (2005).

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. Infections due to Toscana virus, West Nile virus and other arboviruses of interest in Europe. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005; 23: 560-568.

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

Serata D, Rapinesi C, Del Casale A, Simonetti A, Mazzarini L, Ambrosi E, Kotzalidis GD, Fensore C, Girardi P, Tatarelli R. Personality changes after Toscana virus (TOSV) encephalitis in a 49-year-old man: a case report. *Int J Neurosci* 2011; 121: 165-169.

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

Soldan SS, González-Scarano F. Emerging infectious diseases: the Bunyaviridae. *J Neurovirol* 2005; 11: 412-423.

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.

Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Günther S, Ries A, Ziegler U, Müller A, Stich A. Acute Toscana virus infection mimicked by Yersinia-induced reactive arthritis síndrome after journey to Spain. *J Clin Virol* 2010; 47: 104-105.

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

Tesh RB, Lubroth J, Guzman H. Simulation of Arbovirus overwintering: survival of Toscana virus (Bunyaviridae: *Phlebovirus*) in its natural sandfly 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.

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

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.

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 2007; 88: 1288-1294.

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, 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.

Walter CT, Barr JN. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. J Gen Virol 2011; 92: 2467-2484.

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

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 2000. *Wkly Epidemiol Rec* 2000b; 75: 370-371.

Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YLDLM, Zhang QF, Popov VL, Li C, Qu J, Li Q, Zhang YP, Hai R, Wu W, Wang Q, Zhan FX, Wang XJ, Kan B, Wang SW, Wan KL, Jing HQ, Lu JX, Yin WW, Zhou H, Guan XH, Liu JF, Bi ZQ, Liu GH, Ren J, Wang H, Zhao Z, Song JD, He JR, Wan T, Zhang JS, Fu XP, Sun LN, Dong XP, Feng ZJ, Yang WZ, Hong T, Zhang Y, Walker DH, Wang Y, Li DX. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med* 2011; 364: 1523–1532.