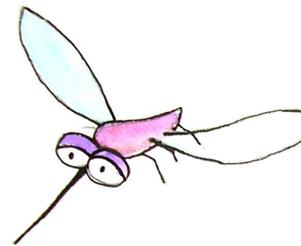
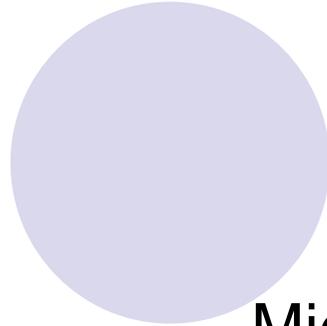
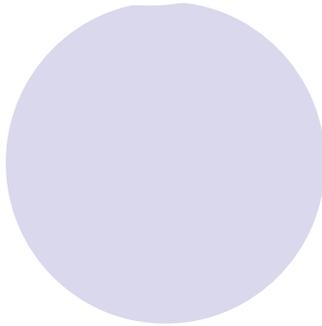
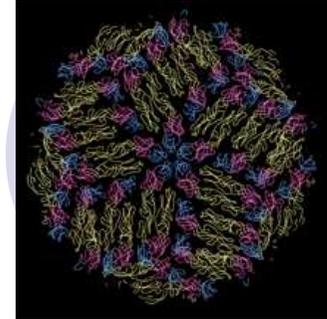
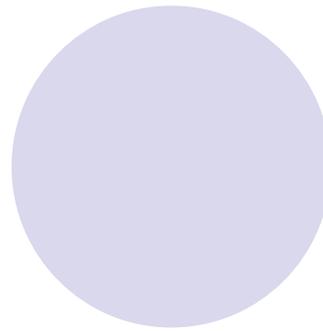
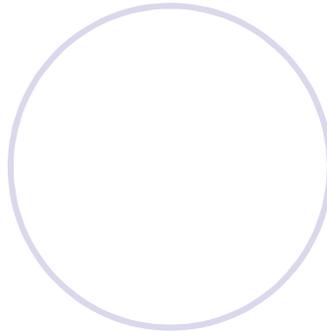


De la incertidumbre a la evidencia: 2003-2010

Ocho años de investigaciones sobre la fiebre/encefalitis por virus West Nile en España



Miguel Angel Jiménez Clavero

Jefe de Servicio de Coordinación P3

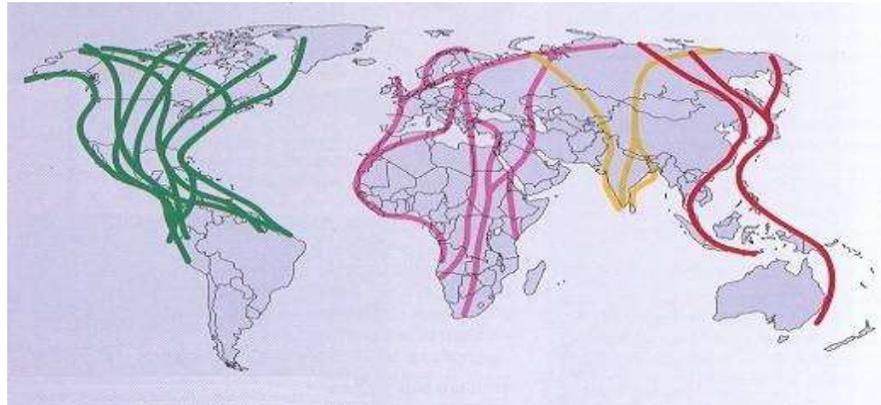
CISA-INIA, Valdeolmos (Madrid)



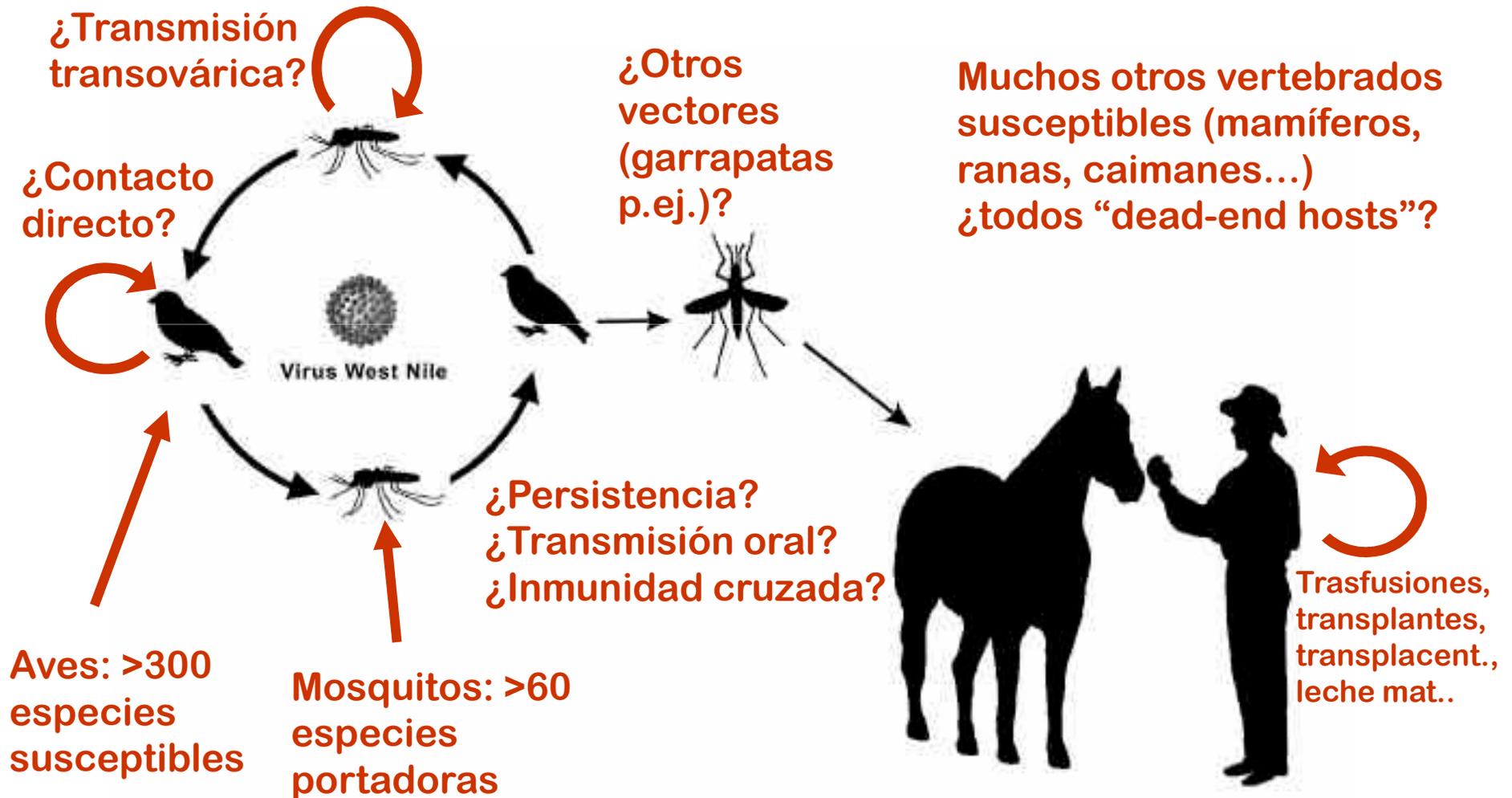
Jornada informativa sobre la enfermedad del Nilo Occidental ("Virus West Nile")
Colegio de Veterinarios de Madrid, 24 de Noviembre de 2010

Virus West Nile (Nilo Occidental, WNV)

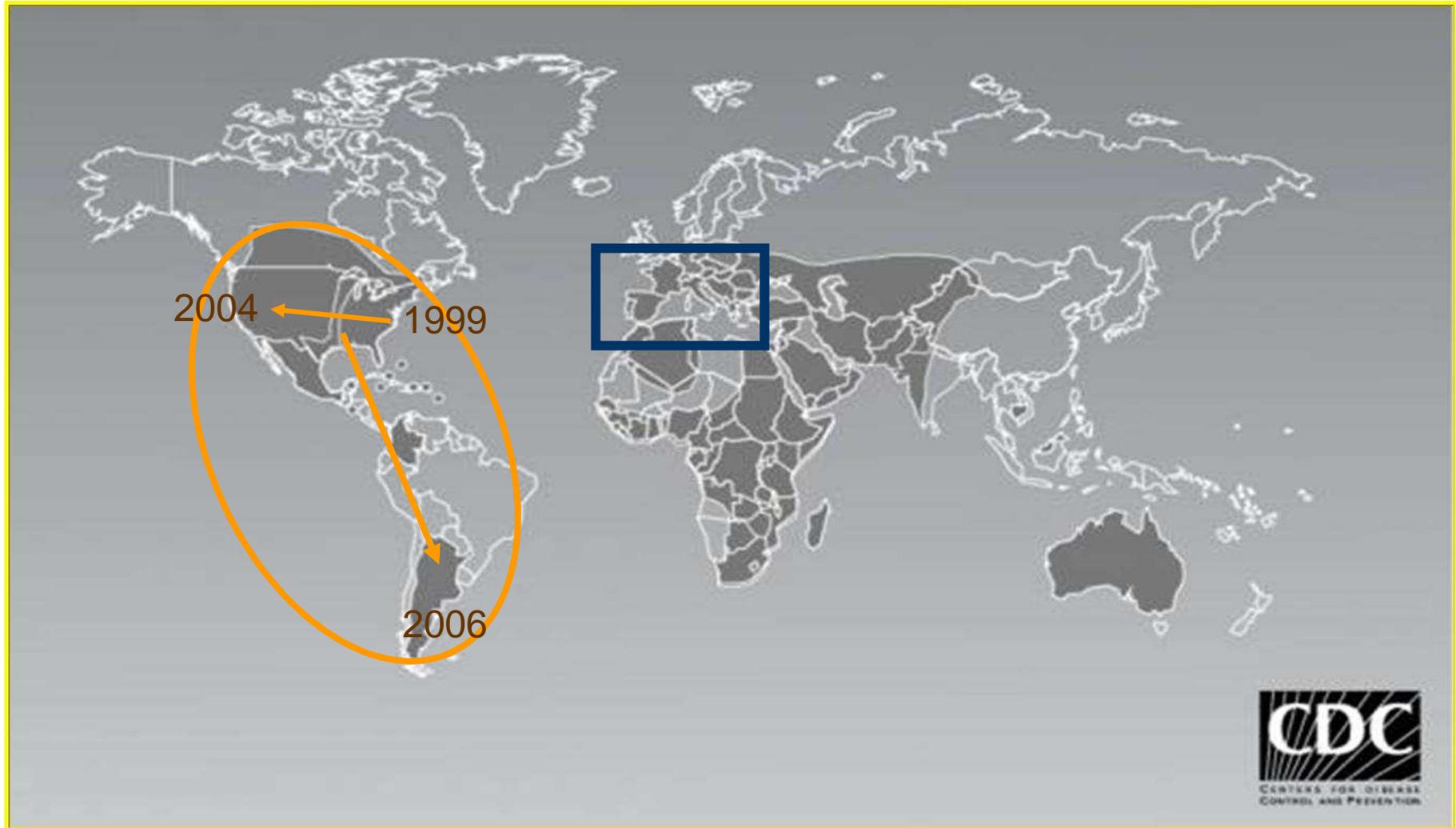
- WNV: **flavivirus** del grupo de la encefalitis japonesa.
- Transmitido (no solo) por **artrópodos**, principalmente (no solo) **mosquitos**, sobre todo (no siempre) del género **Culex**.
- Principales reservorios: **aves**.
- Éstas pueden acarrear el virus en sus **migraciones**, translocándolo de unas zonas a otras.
- **Patogénico ocasionalmente en aves**, dependiendo de la especie de ave y de la variante del virus de que se trate.
- **Patogénico ocasionalmente en algunos mamíferos**.
- Eco-epidemiología **compleja**.



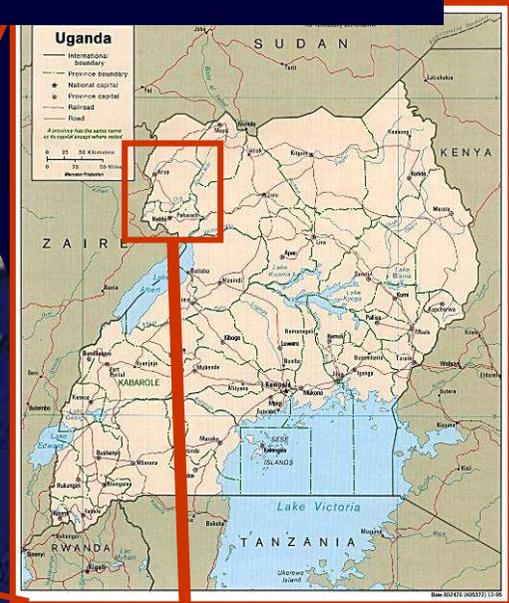
Virus West Nile : un flavivirus epizootico, epornitico y zoonotico



Virus West Nile : un flavivirus *emergente*



Out of Africa...



Distrito de *West Nile*
Uganda, 1937

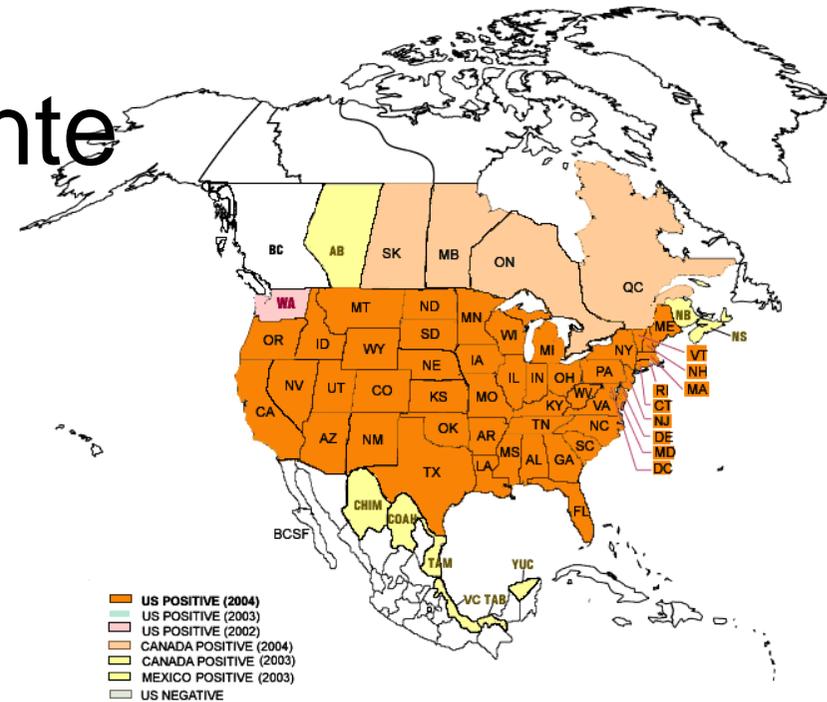
WNV: historia reciente

- Hasta hace poco, WNV era considerado un virus de **poca importancia** (“**fiebres africanas**”).
- Pero en los últimos años del siglo XX produjo brotes cada vez más graves:
 - **Rumanía, 1996**, 1000 casos, 396 graves (17 muertes).
 - **Volgogrado (sur de Rusia), 1999**, 1000 casos de meningitis/encefalitis confirmados, 40 muertes.
 - **Israel, 1998-2000**: 400 casos, 35 muertes.
- Hasta que en 1999 **cruzó el Atlántico...**



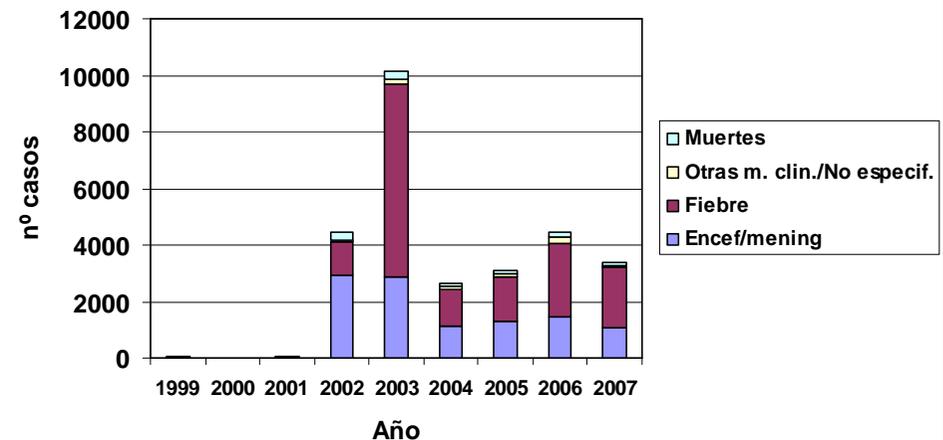
WNV: historia reciente

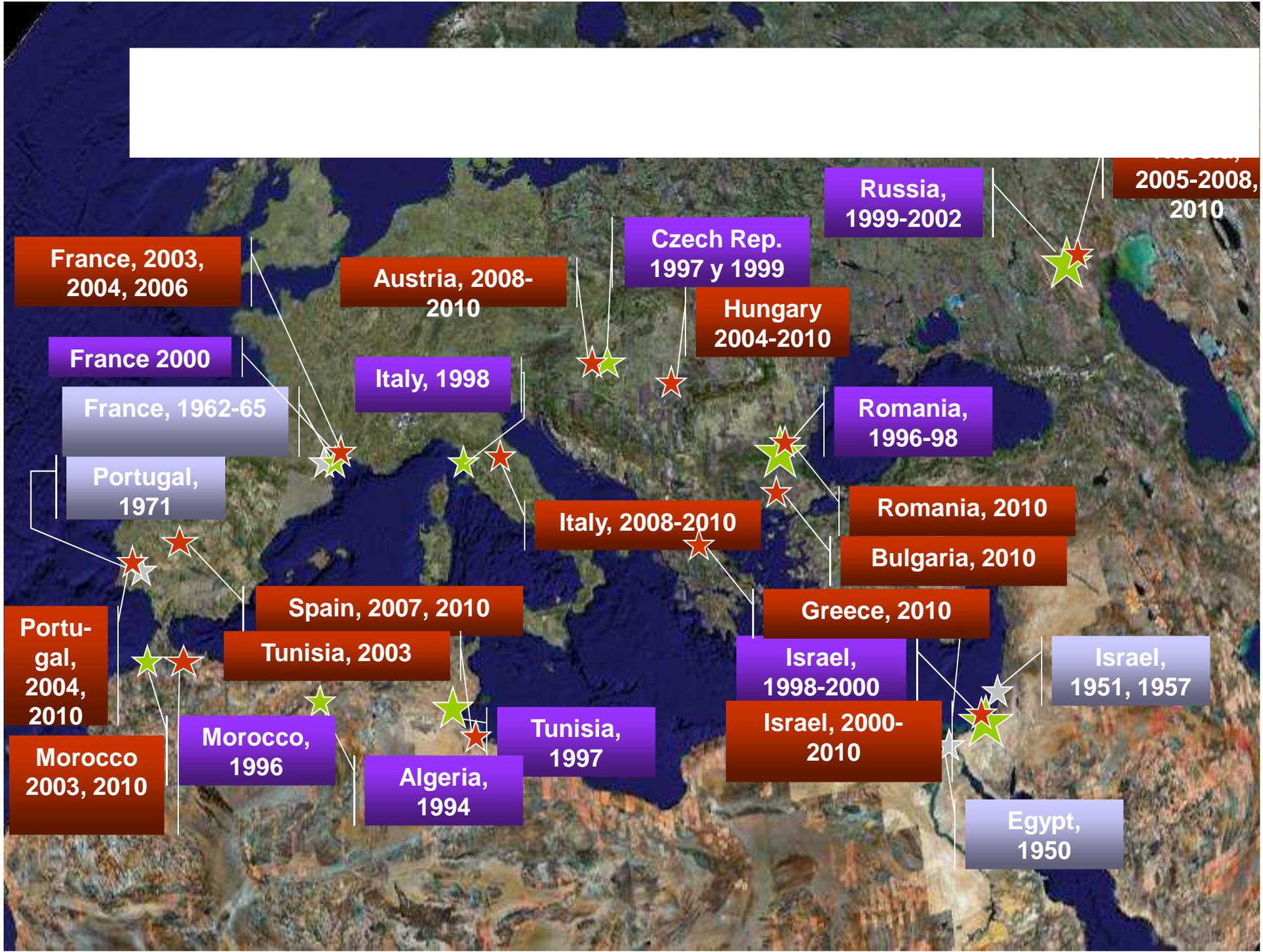
- ¡...apareciendo en Nueva York!
- Desde entonces no ha parado de extenderse por toda **América**, de costa a costa y desde Canadá hasta Argentina.
- En Norteamérica WNV es considerado ya **endémico**.
- En EE.UU. desde 1999 ha habido unos **29.000 casos humanos**, de ellos unos **1200 han sido mortales**.
- Las **aves silvestres** son muy sensibles a la infección, produciéndose en ellas una gran mortalidad.
- Una de las **arbovirosis zoonóticas, epizoóticas y eporníticas** más importantes de la historia.
- **Por todo ello, el WNV se ha convertido en uno de los virus con más repercusión pública.**

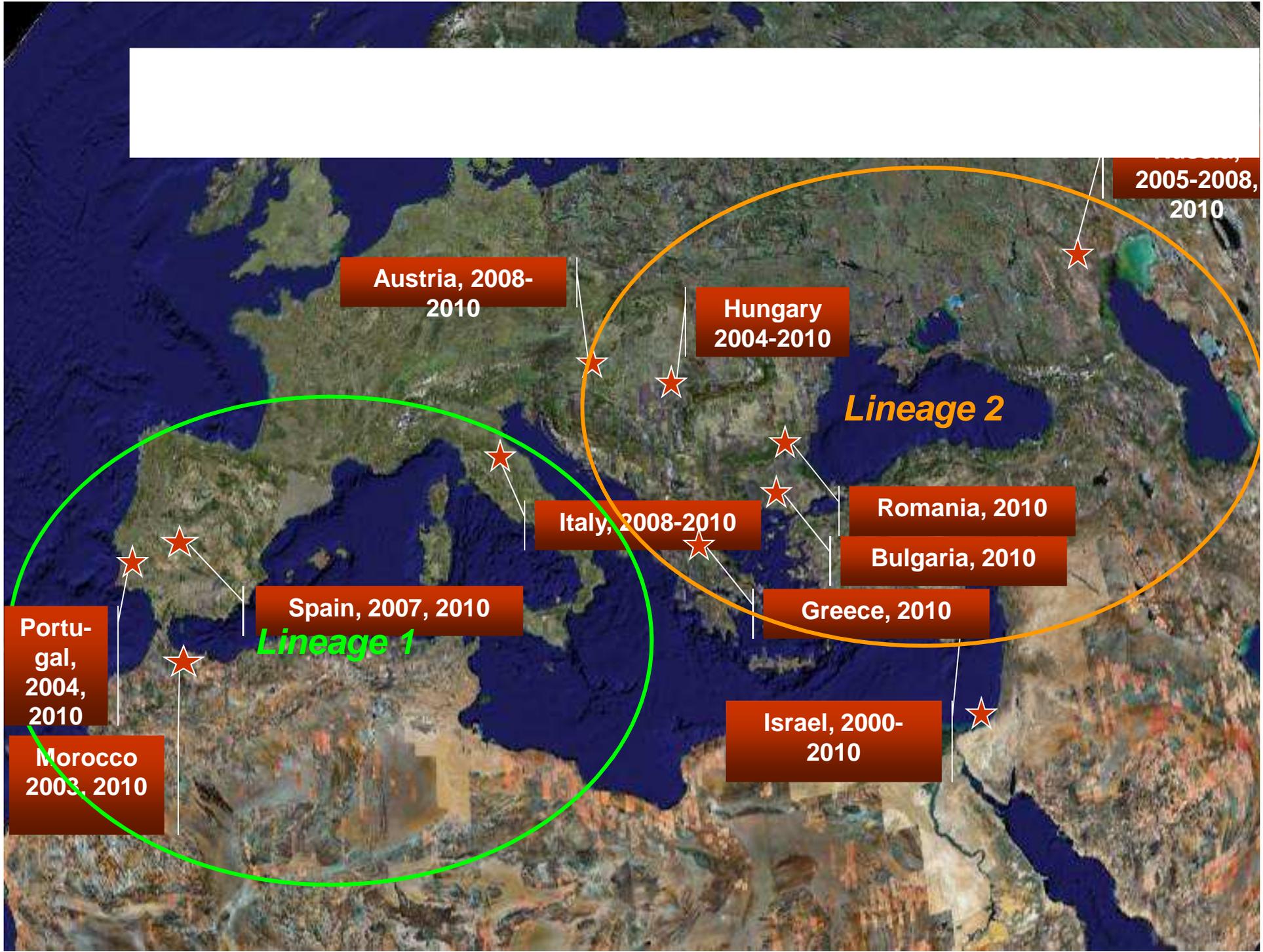


Casos WNV en EE.UU. 1999-2007*

(*Hasta el 6 de noviembre)

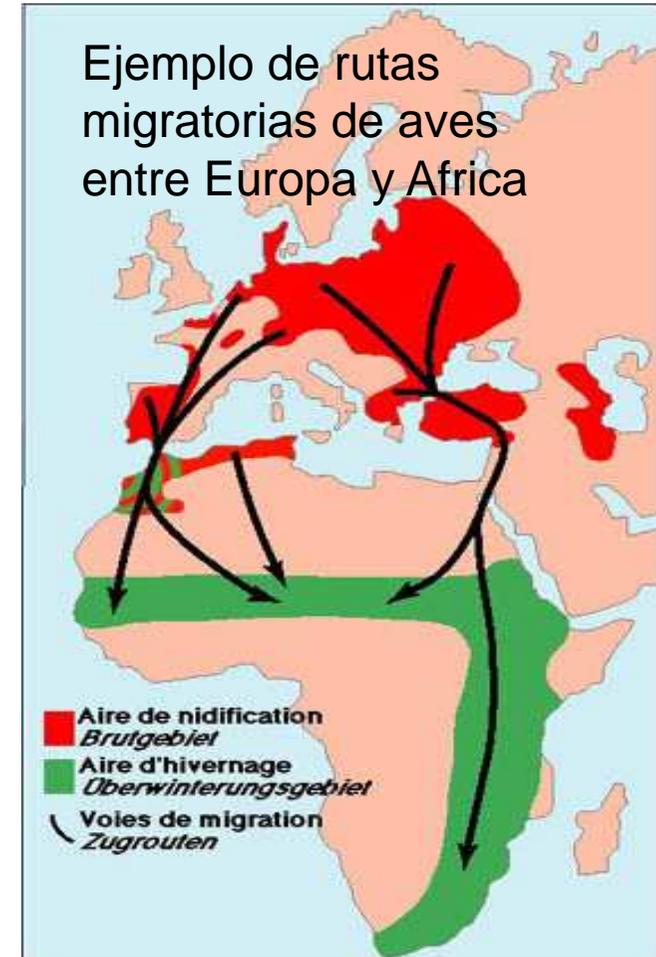






Virus West Nile: tendencias

- Cada vez **más frecuente** ¿**persistente**? en Europa y cuenca mediterránea.
- Más casos **humanos**.
- Mayor afección **en aves silvestres**.
- **Nuevo linaje** en Europa (L2).
- **Clima**: básico para entender la epidemiología.
- Cuestiones:
 - ¿**Son los virus recientes más patogénicos**?
 - ¿**WNV persiste en Europa o es introducido cada vez desde África**?



Virus West Nile en España: hitos

- **70' -80' del s. XX:** anticuerpos hemaglutinantes vs. flavivirus en **roedores** y **humanos**.
2001: Seroprevalencia en **humanos** en Sevilla (0.6%) y Delta del Ebro (0.2%).
2000-05: Alta seroprevalencia en **rapaces** de Castilla-La Mancha. Detección de **genoma** vírico.
2003-2006: Seroprevalencia significativa en determinadas especies de **aves** en el bajo Guadalquivir. **Seroconversiones**.
2005-07: Seroprevalencia significativa en **caballos** en libertad en Doñana.
2004: Primer caso clínico en **humanos**.
2004-2008: Genoma vírico en **mosquitos**, Huelva y Doñana.
2007: Primer aislamiento del WNV en España, **aves silvestres** (águila real), Castilla-La Mancha.
2010: Cádiz, primeros casos clínicos en **caballos**. Dos casos clínicos en **humanos**.



WNV en España: situación actual

- 26 y 30 de agosto de 2010: primeros casos sospechosos en caballos, Jerez de la Frontera.
- 2 septiembre: cELISA+
- 10 septiembre: **IgM+** → Notificación a la **OIE**.
- Primera caracterización molecular: **linaje 1a**, “cluster” mediterráneo occidental.
- Inicio de investigación epidemiológica, serovigilancia.
- Aislamiento y secuenciación molecular completa (en curso).



Print
Close

Information received on 10/09/2010 from Dr Lucio Ignacio Carbajo Goni , Subdirector General de Sanidad de la Producción Primaria, Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, Spain

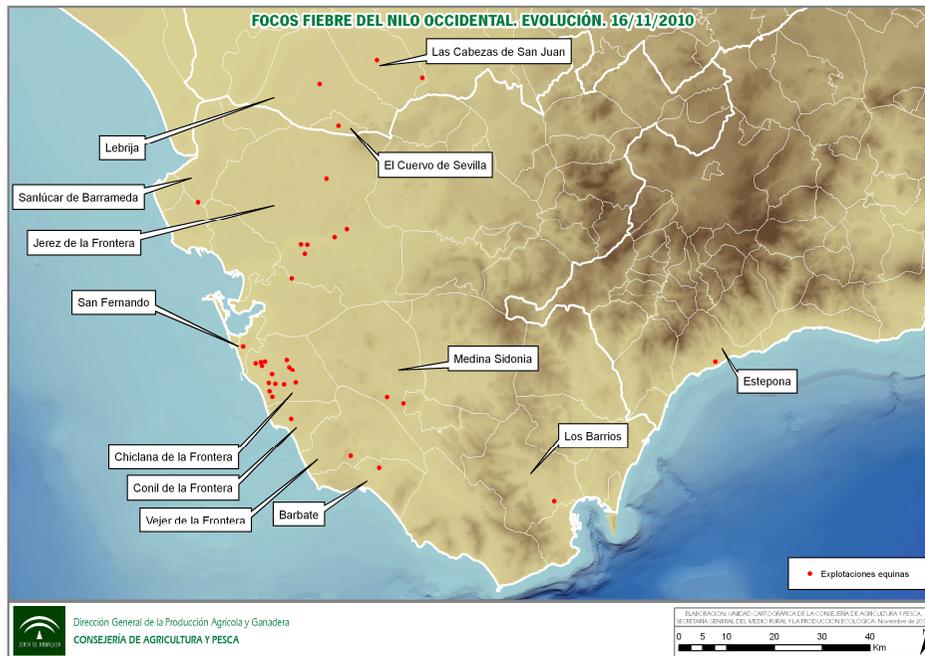
Summary

Report type	Immediate notification
Start date	26/08/2010
Date of first confirmation of the event	02/09/2010
Report date	10/09/2010
Date submitted to OIE	10/09/2010
Reason for notification	First occurrence of a listed disease
Manifestation of disease	Clinical disease
Causal agent	West Nile fever virus
Nature of diagnosis	Clinical, Laboratory (basic), Laboratory (advanced)
This event pertains to	a defined zone within the country
Related reports	<ul style="list-style-type: none">• Immediate notification (10/09/2010)• Follow-up report No. 1 (01/10/2010)• Follow-up report No. 2 (03/11/2010)



WNV en España: situación actual

- Focos (equinos) a 18-11-2010:
 - 34 focos, 41 caballos afectados, 10 muertos.

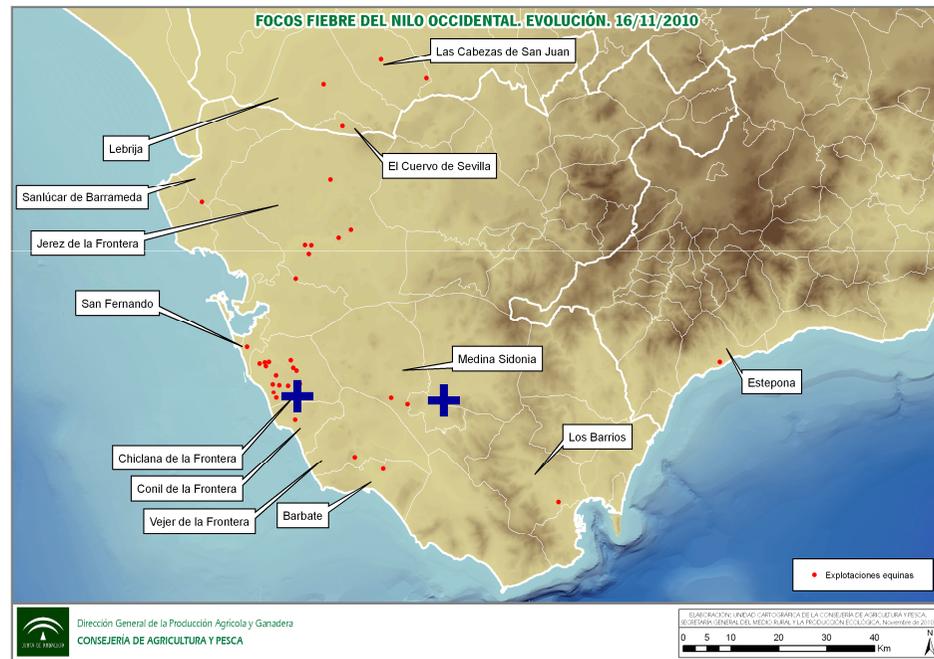


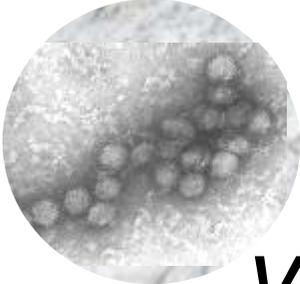
FOCOS DE FIEBRE DEL NILO OCCIDENTAL (WEST NILE) EN ANDALUCIA

FECHA DE CONFIRMACIÓN DE FOCO	MUNICIPIO DE LA EXPLOTACIÓN	PROVINCIA	Numero caballos positivos	MUERTOS
10.09.2010	Jerez de la Frontera	Cádiz	1	
10.09.2010	Jerez de la Frontera	Cádiz	1	
10.09.2010	Jerez de la Frontera	Cádiz	3	2
10.09.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	
20.09.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	
24.09.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	
24.09.2010	Vejer de la Frontera	Cádiz	1	
24.09.2010	San Fernando	Cádiz	1	
24.09.2010	Jerez de la Frontera	Cádiz	1	1
24.09.2010	Lebrija	Sevilla	1	
30.09.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	?	1
30.09.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	
30.09.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	1
30.09.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	
30.09.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	
30.09.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	
14.10.2010	Jerez de la Frontera	Cádiz	1	1
14.10.2010	Las Cabezas de San Juan	Sevilla	1	1
14.10.2010	Medina Sidonia	Cádiz	1	1
14.10.2010	Los Barrios	Cádiz	1	
14.10.2010	Barbate	Cádiz	1	
14.10.2010	Conil de la Frontera	Cádiz	1	
15.10.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	
15.10.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	
15.10.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	
15.10.2010	Chiclana de la Frontera	Cádiz	1	1
15.10.2010	Jerez de la Frontera	Cádiz	6	
15.10.2010	Jerez de la Frontera	Cádiz	1	
26.10.2010	Estepona	Málaga	1	
11.11.2010	El Cuervo	Sevilla	1	
16.11.2010	Las Cabezas de San Juan	Sevilla	1	1
16.11.2010	Sanlúcar de Barrameda	Cádiz	1	
18.11.2010	Los Barrios	Cádiz	1	

WNV en España: situación actual

- Casos humanos:
 - 1º, Varón, 60 años, residente en Chiclana de la Frontera. Ingreso en el Hospital de Puerto Real el 20-9-2010 con signos de meningitis.
 - 2º, Varón 77 años, residente en Benalup-Casas Viejas. Ingresó en el hospital de Puerto Real el 28 de septiembre con signos de meningitis.

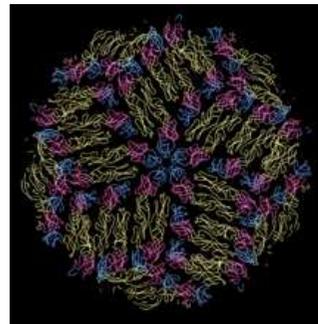
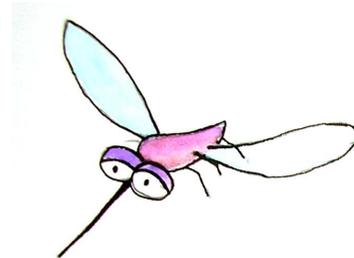




Investigaciones sobre el virus West Nile en el CISA



- Diagnóstico
- Seroepidemiología
- Estudios virológicos y moleculares
- Patogénesis



Estudios sobre WNV en el CISA: Nuevos métodos diagnósticos

- Moleculares: RRT-PCR multiplex para la detección simultánea y diferencial de WNV L1, WNV L2 y USUV en la misma reacción.

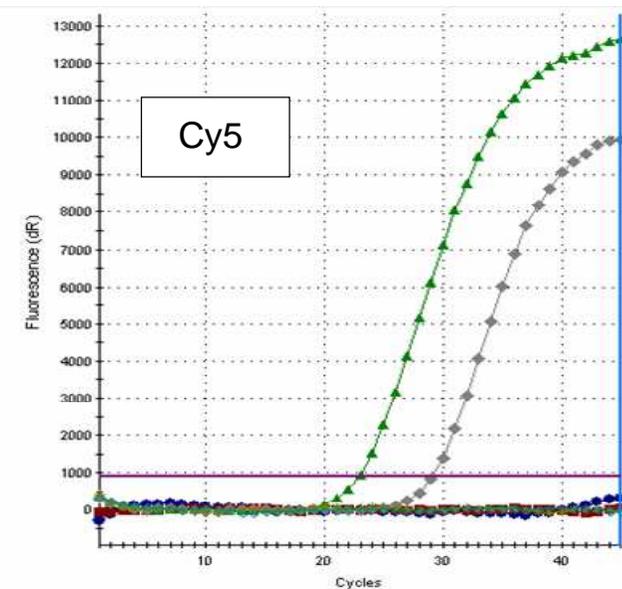
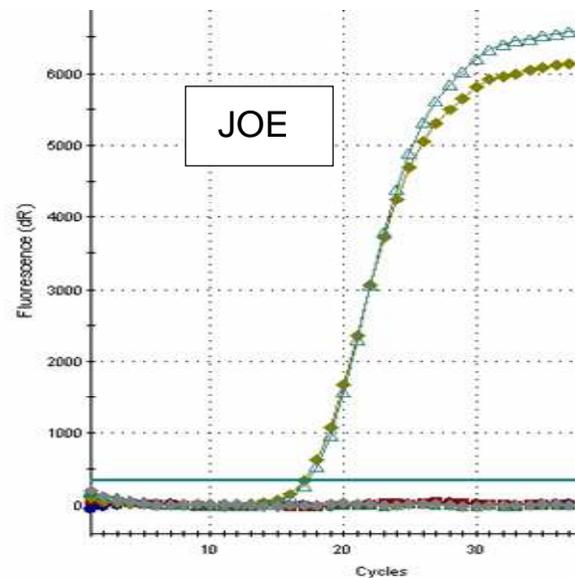
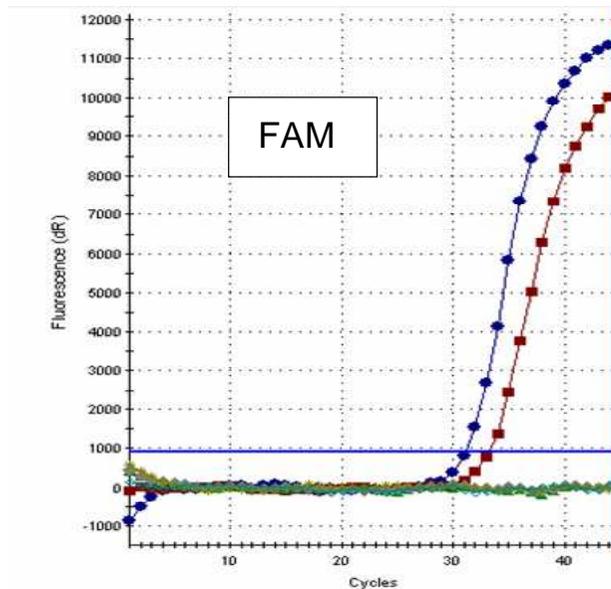
Tres sondas marcadas con tres fluoróforos que emiten señales a valores de λ no solapantes



FAM: 492-516 nm

JOE-VIC: 535-555 nm

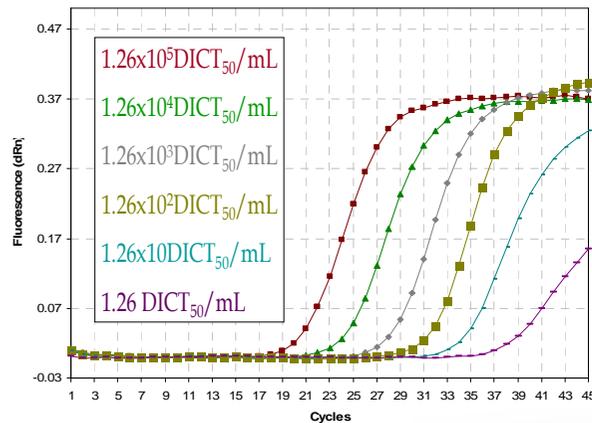
Cy5: 635-665 nm



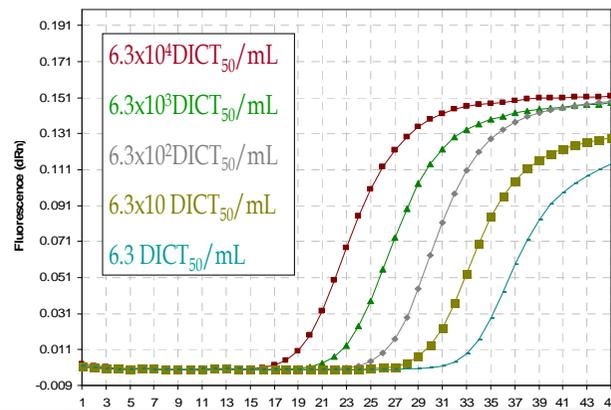
Estudios sobre WNV en el CISA: Nuevos métodos diagnósticos

- Moleculares: RRT-PCR multiplex para la detección simultánea y diferencial de WNV L1, WNV L2 y USUV en la misma reacción.

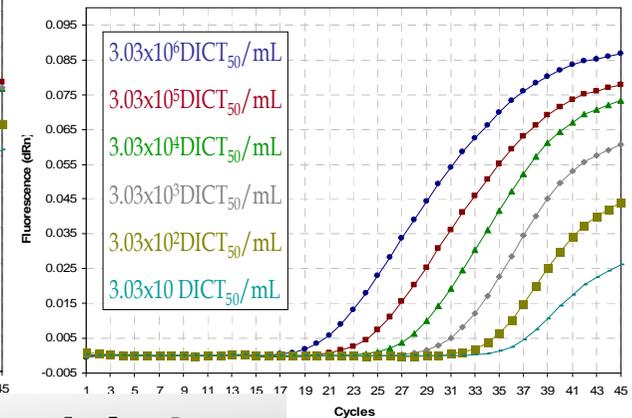
WNV L1 NY'99 equine



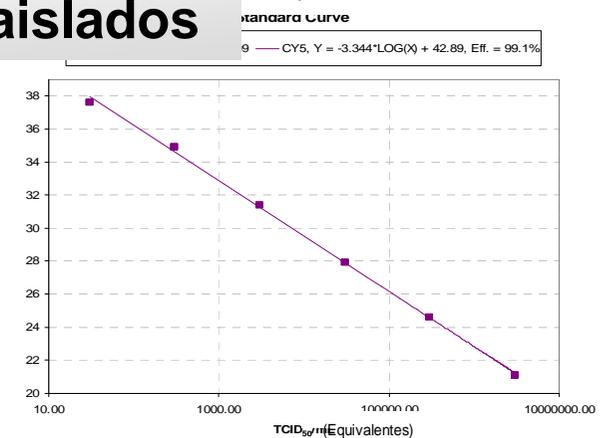
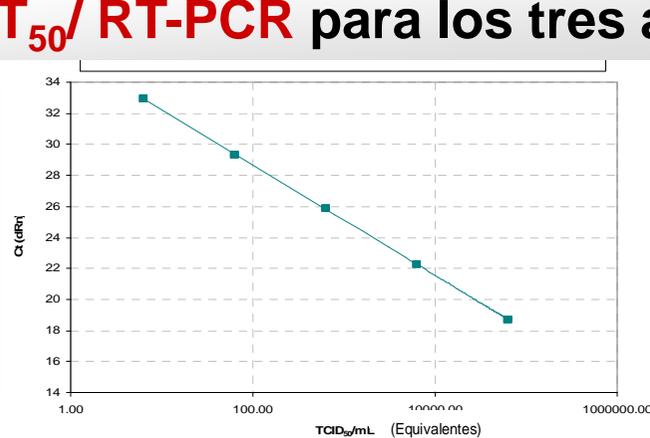
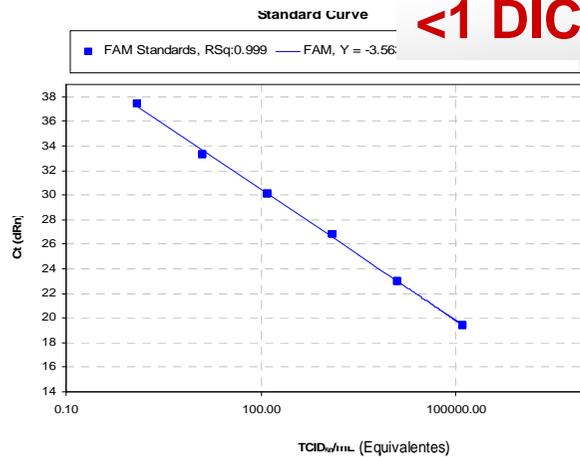
WNV L2



USUV SAAR 1776



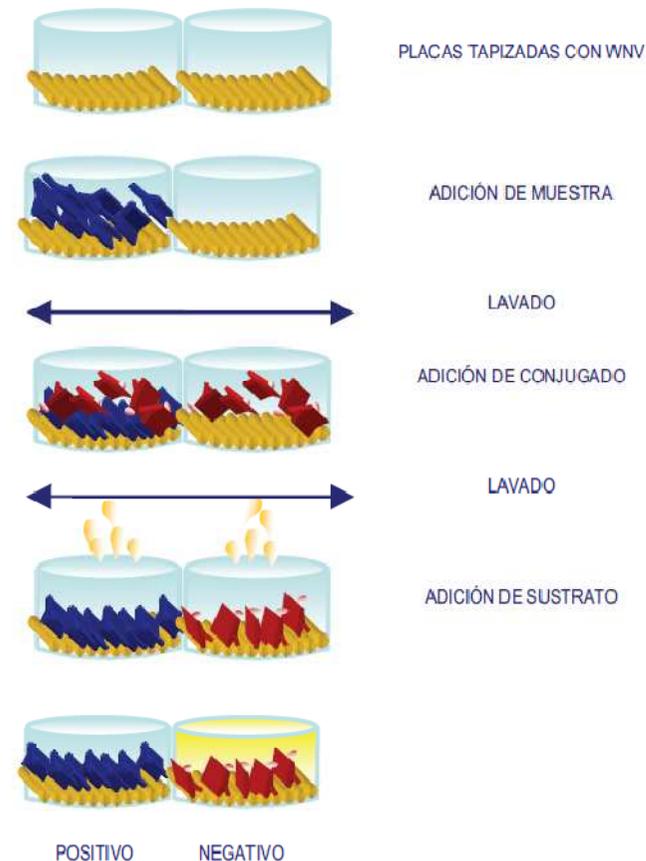
<1 DICT₅₀/ RT-PCR para los tres aislados



Estudios sobre WNV en el CISA: Nuevos métodos diagnósticos

- ELISA de detección de anticuerpos frente a WNV

- Desarrollado en colaboración con la empresa INGENASA.
- Válido para anticuerpos en suero de amplio rango de especies hospedadoras, desde aves hasta mamíferos.
- Ventajas:
 - Bajo consumo de muestra (10 ml de suero).
 - Alta sensibilidad y especificidad.
 - Detecta Ac a 3 dpi en aves infectadas experimentalmente.
 - Detecta Ac frente a distintos linajes de WNV.



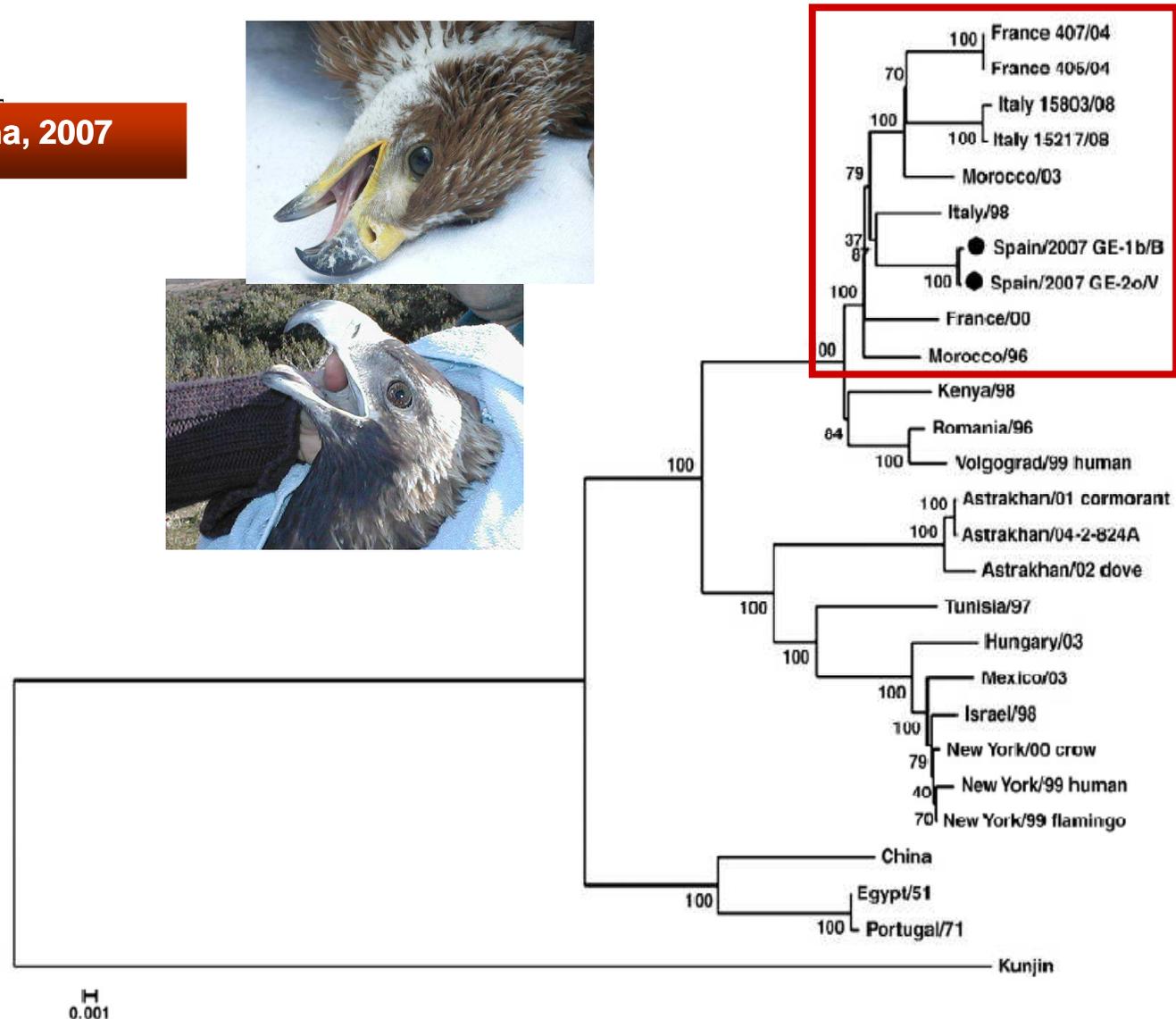
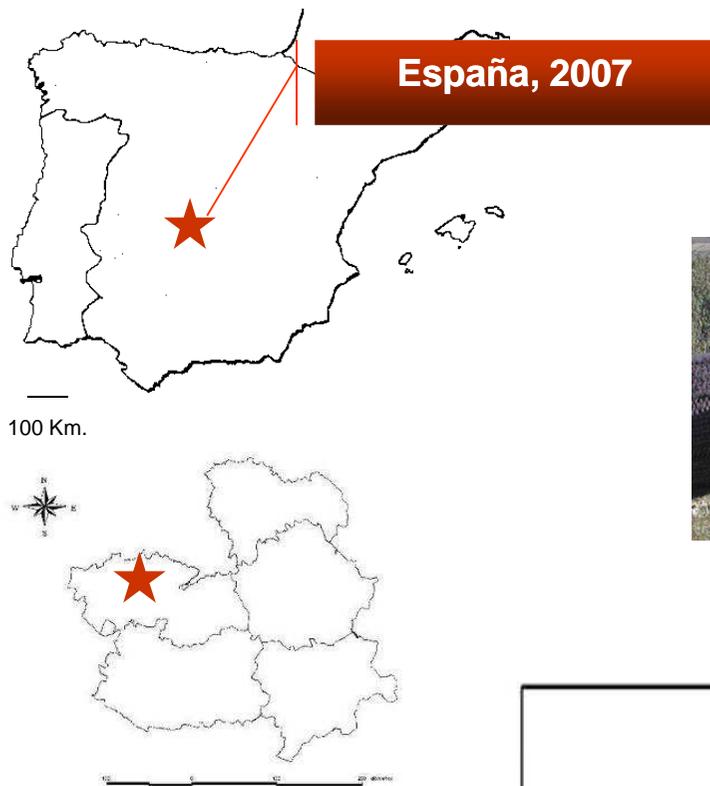
INGEZIM WEST NILE Compac
R.10.WNV.K3

Estudios sobre WNV en el CISA: Estudios serológicos en aves y caballos.

- Doñana y marismas del Guadalquivir:
 - Seroprevalencias por especies.
 - Seroprevalencia en pollos de aves migratorias que crían en España.
 - Migración y seroprevalencia en passeriformes.
 - Seroprevalencia en aves que ingresan en los CREAS.
 - Seroprevalencia en caballos en libertad.
- Castilla-La Mancha:
 - Rapaces protegidas



Estudios sobre WNV en el CISA: Estudios virológicos, primeros aislados virales españoles.

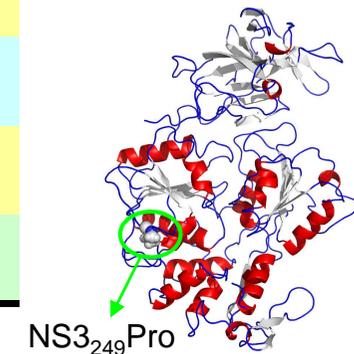


Estudios sobre WNV en el CISA

- Estudios de patogénesis

- En modelo murino:

Cepa	NS3 ₂₄₉	DL ₅₀ (PFU)	Tiempo medio de supervivencia ± SD (días)
SP`07	Pro	17,78	9,38 ± 1,51
M0`03	Thr	1,78	9,93 ± 1,86
NY`99	Pro	2,31	8,83 ± 1,17
B956	His	39,32	10,55 ± 1,5



NS3₂₄₉Pro no es un determinante de patogenicidad consistente

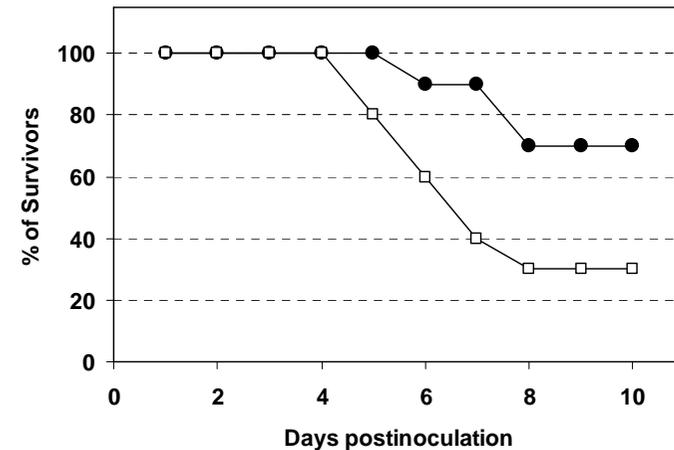
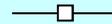
Virulencia en un modelo aviar autóctono del Sur de Europa: la perdiz roja (*Alectoris rufa*)



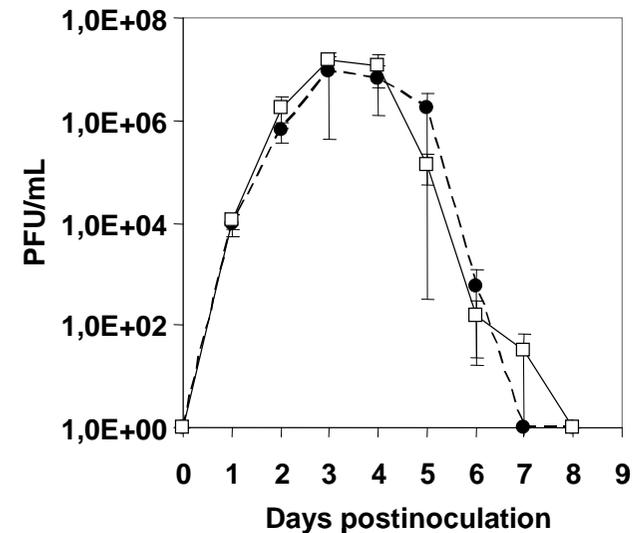
WNV SPA/2007
(NS3₂₄₉Pro)



WNV Mor/2003
(NS3₂₄₉Thr)



- Ambas cepas del Mediterráneo Occidental son patogénicas en la perdiz roja.
- La cepa Morocco/2003 (NS3₂₄₉Thr) es más virulenta que Spain/2007 (NS3₂₄₉Pro).
(Sotelo et al, Vet Res, en prensa).

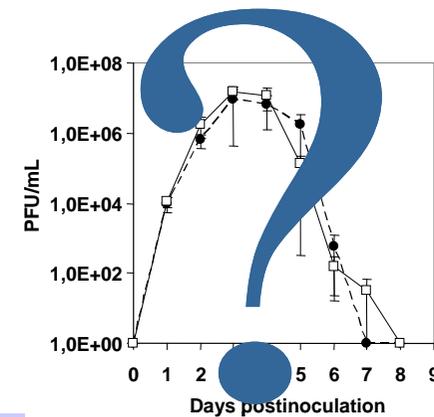
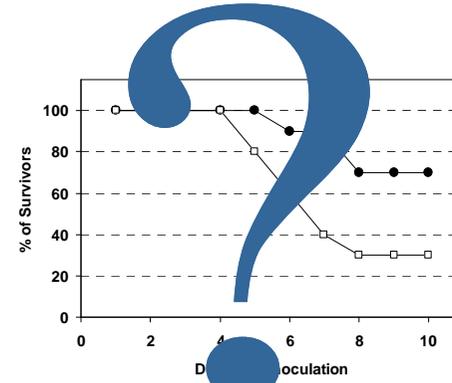


Virulencia en un modelo aviar eurasiático abundante en los humedales españoles: la focha común (*Fulica atra*).



WNV SPA/2007
(NS3₂₄₉Pro)

WNV NY99
(NS3₂₄₉Pro)



Estudio pendiente de análisis de resultados

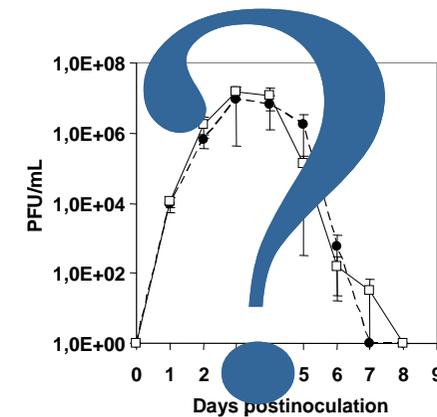
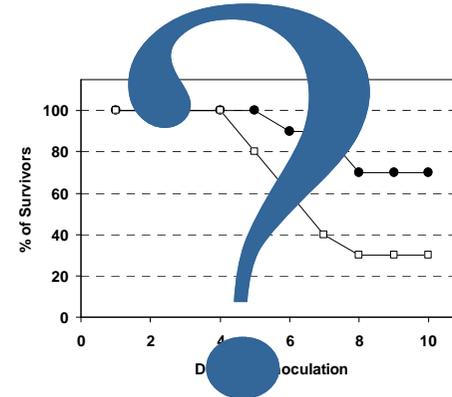
Virulencia en un modelo aviar peridoméstico: el gorrión común (*Passer domesticus*).



WNV SPA/2007

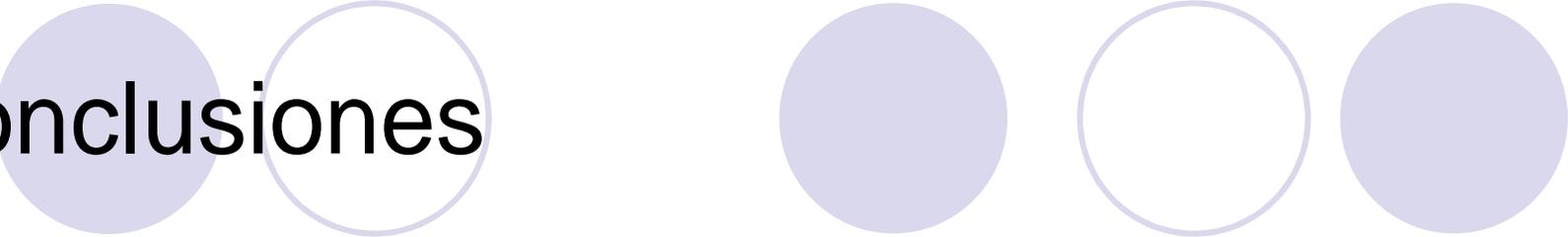
WNV NY99

WNV Italia/2008



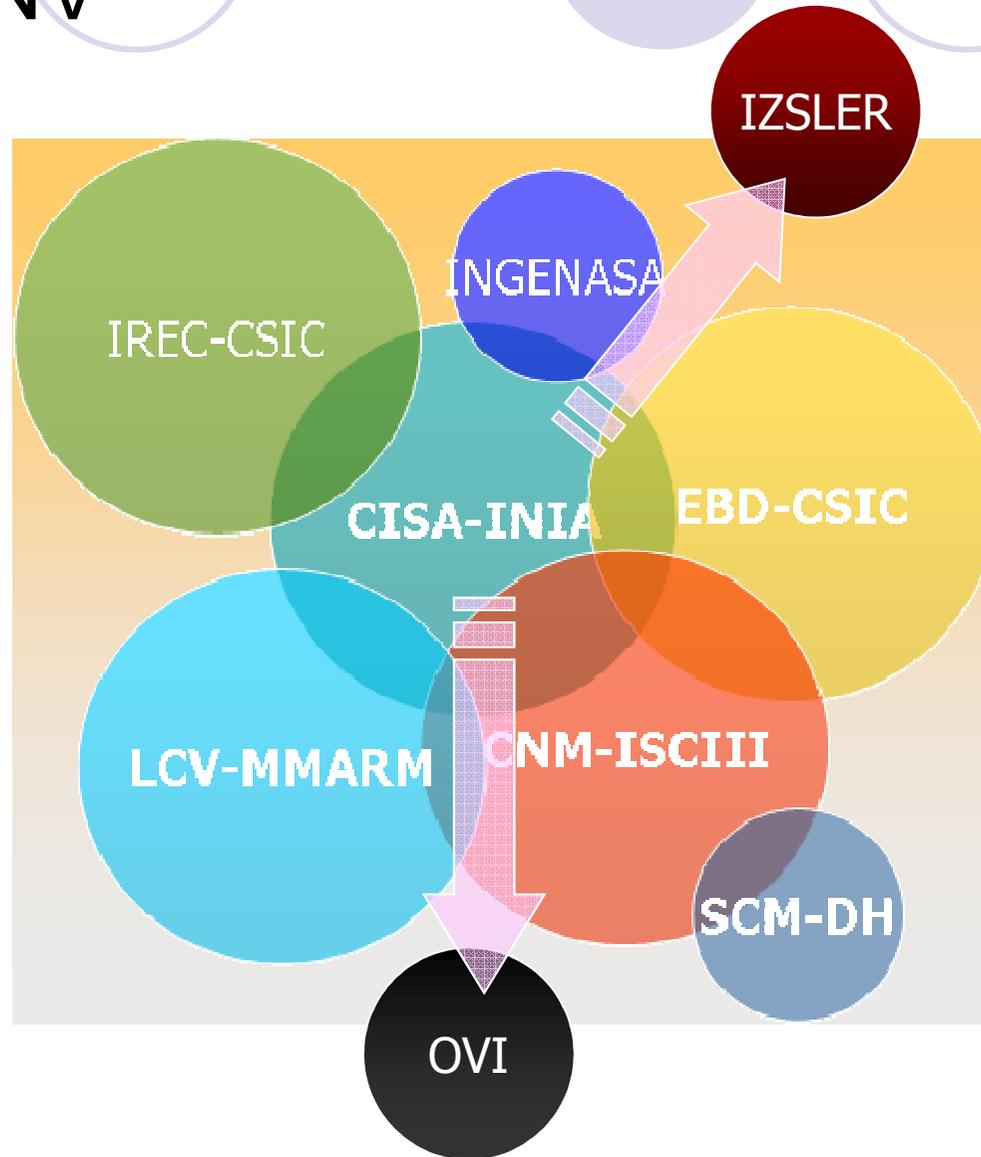
Estudio en curso actualmente en el CISA

Conclusiones



- Desde aproximadamente el año 2003 hemos obtenido evidencias cada vez más consistentes de la **presencia del virus West Nile en España**.
- Nuestros datos sugieren que ha habido una **circulación continuada** del virus en la **región mediterránea occidental** desde hace al menos **13 años**.
- Algunas cepas **euro-mediterráneas** del virus son **tan virulentas como las norteamericanas**. Otras no.
- La mutación **T-NS3₂₄₉-P**, presente en aislados españoles, **no es un marcador consistente de patogenicidad**.
- En algunas **especies euro-mediterráneas de aves (perdiz roja)** la infección es **letal** en una proporción significativa de infecciones. Estas aves son capaces de **transmitir la infección**.
- Seguimos trabajando con otras especies de aves para evaluar su **susceptibilidad a la enfermedad** y su **papel epidemiológico** en nuestro país.

Colaboraciones del CISA en investigación sobre WNV

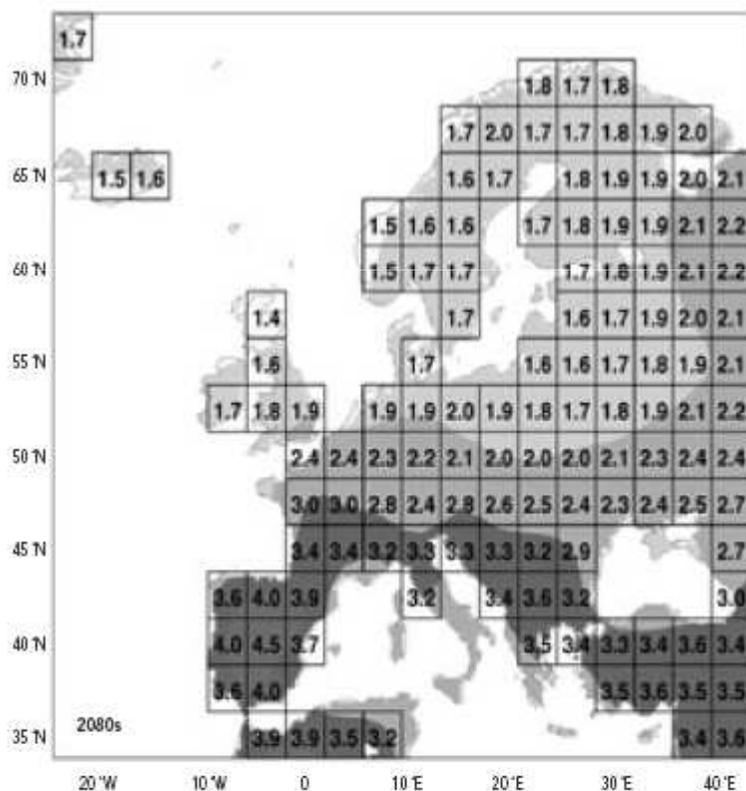


¡Muchas gracias!

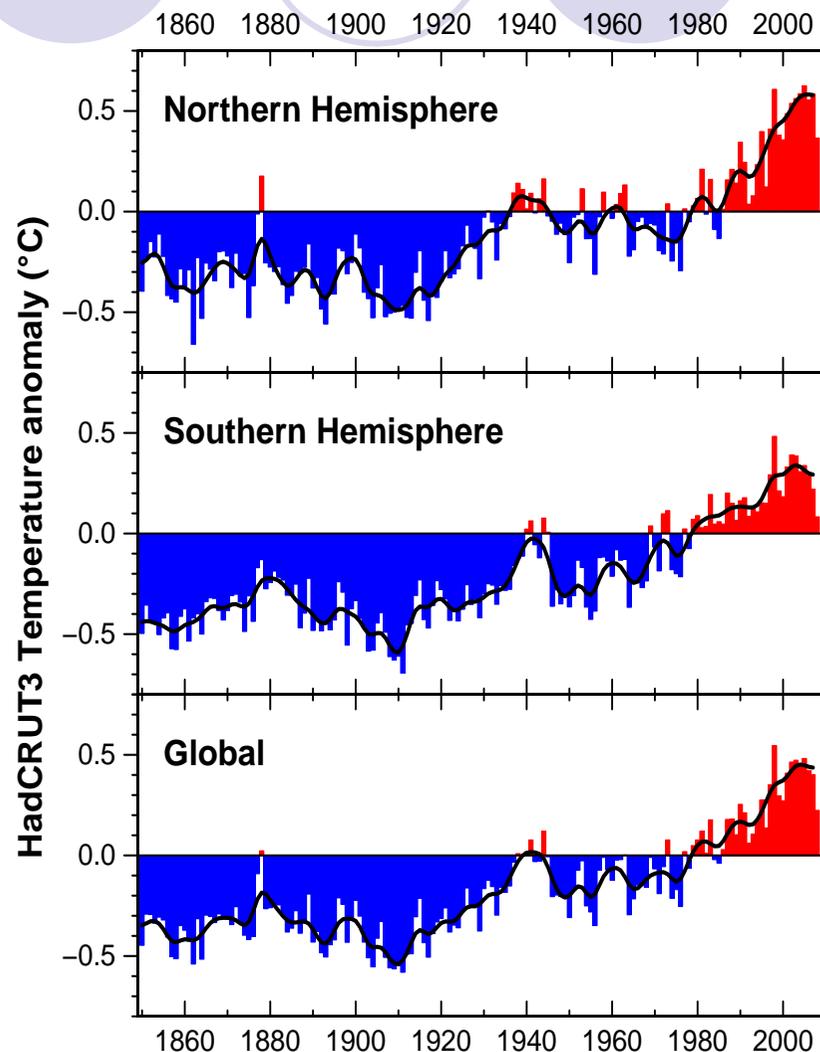


Cambio climático y arbovirosis

- Artrópodos: hábitat condicionado por la temperatura



Note: Temperature change (°C). Relative to average temperature in the period 1961–1990. Intermediate ACACIA scenario in a broad range of possible future emissions.
Source: IPCC, 2001b; Parry *et al.*, 2000.



Fuente: Climate Research Unit
www.cru.uea.ac.uk/cru/data/temperature

WNV: factores implicados en la transmisión

- En un lugar y época concretos la transmisión depende de:
 - Vectores:
 - Competencia vectorial.
 - Abundancia vectorial:
 - Hábitat (→ disponibilidad de agua, temperatura adecuada, humedad, etc).
 - Longevidad (→ función de la temperatura).
 - Hábitos de alimentación.
 - Huéspedes:
 - Capacidad como reservorio de la especie animal infectada.
 - Abundancia de individuos competentes como reservorio.
 - Estatus inmunológico de la población.
 - Inmunidad previa (cruzada o no).
 - Hábitos ecológicos de los reservorios (hábitats, movimientos, etc).
 - Presencia de especies “sumidero”.
 - Interacciones vector-huésped:
 - Distribución espacial y temporal.



WNV: factores implicados en la persistencia

- Mecanismos de supervivencia al invierno (*overwintering*).
 - En los vectores:
 - Temperaturas bajas (aunque mayores de 10°C) prolongan la vida del vector (diapausa).
 - Poblaciones de mosquitos refugiadas en hábitats “protegidos”.
 - Transmisión transovárica (persistencia *in ovo*) → poco eficaz.
 - Garrapatas (u otros artrópodos) como “reservorio de invierno”.
 - En los huéspedes:
 - Infección crónica/persistencia vírica.
 - Transmisión no vectorial.
 - En el ambiente:
 - Cadáveres infectados (carroña).

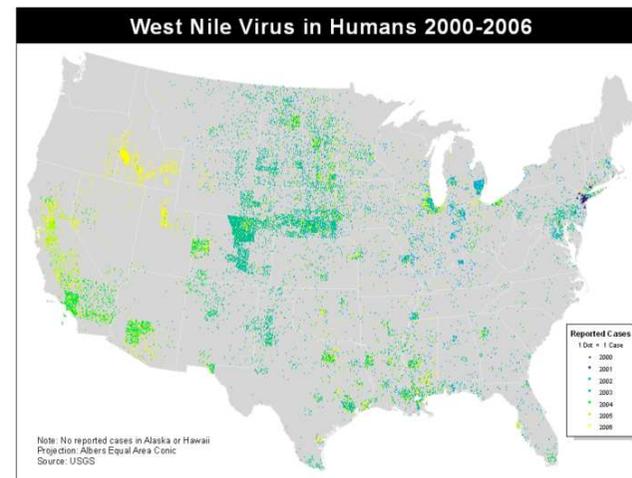
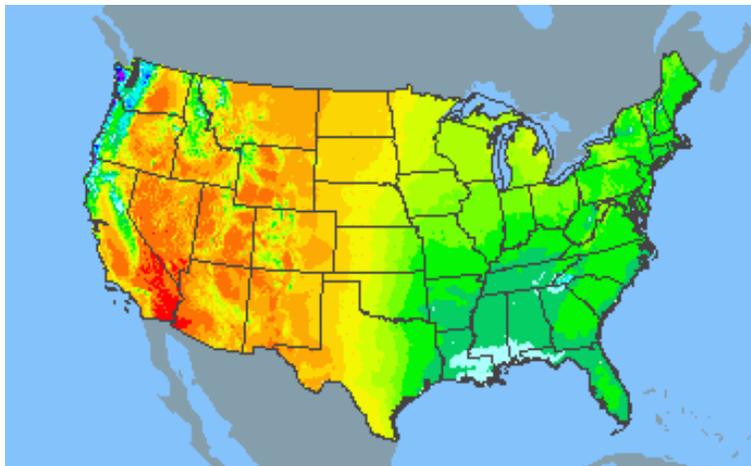


WNV: eco-epidemiología, viejo mundo

- En general, el virus parece circular de forma “silenciosa” en un ciclo silvático o rural. Solamente ciertas circunstancias hacen “desbordar” (*spillover*) este ciclo, abocándolo a un “ciclo urbano”.
- A veces su actividad ha sido precedida de **desbordamientos** ó **riadas** (Bohemia, 1997).
- Otras a construcciones de presas (Portugal, 1969) o **nuevos regadíos** (Marruecos, 1996).
- Otras a **veranos anormalmente secos** (Camarga, 2003).
- Abundante **agua en primavera** favoreciendo el hábitat de los vectores, seguido de un **verano muy caluroso y seco** (exceso de mosquitos y escasez de aves a final del verano), parece desencadenar un proceso que en ciertas latitudes desborda el ciclo rural de transmisión.

WNV: eco-epidemiología, nuevo mundo

- En EE.UU. la situación es diferente.
- Tras su reaparición 11 temporadas seguidas, el virus puede considerarse endémico en algunas zonas de los EE.UU.
- Las aves parecen más susceptibles, detectándose una alta mortalidad en determinadas especies.
- Las epidemias más severas no han tenido lugar en deltas de grandes ríos, sino en lugares templados y no excesivamente húmedos.



El virus WN en Europa

- Oleadas cada 30 años
- Casos esporádicos
- Brotes autolimitados:
 - En el espacio: poca expansión geográfica
 - En el tiempo: persisten unos pocos años y se extinguen
- Escasa afección en humanos
- Escasa patogenicidad en aves silvestres
- **Brotes recientes (Rumanía, Israel, Rusia): “diferentes”**
 - Mayor patogenicidad en aves
 - Cientos de casos humanos

El virus WN en América

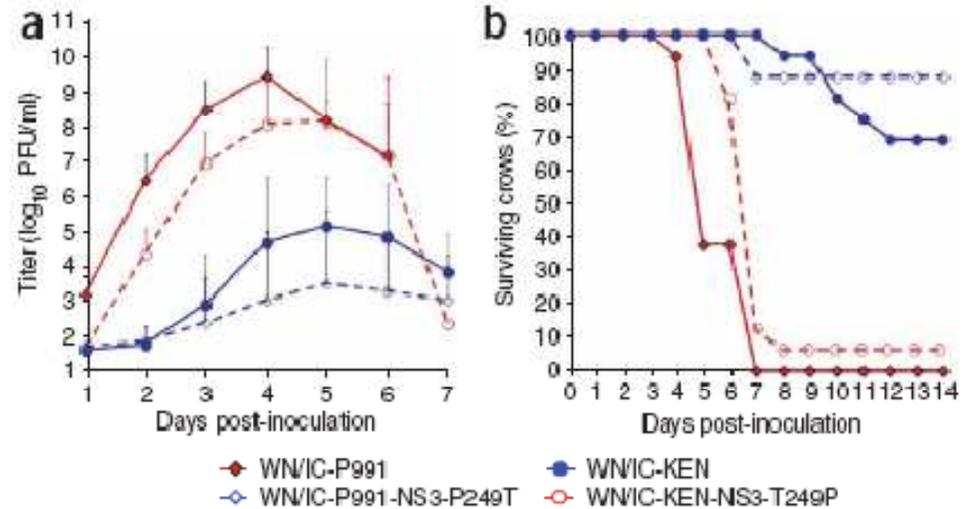
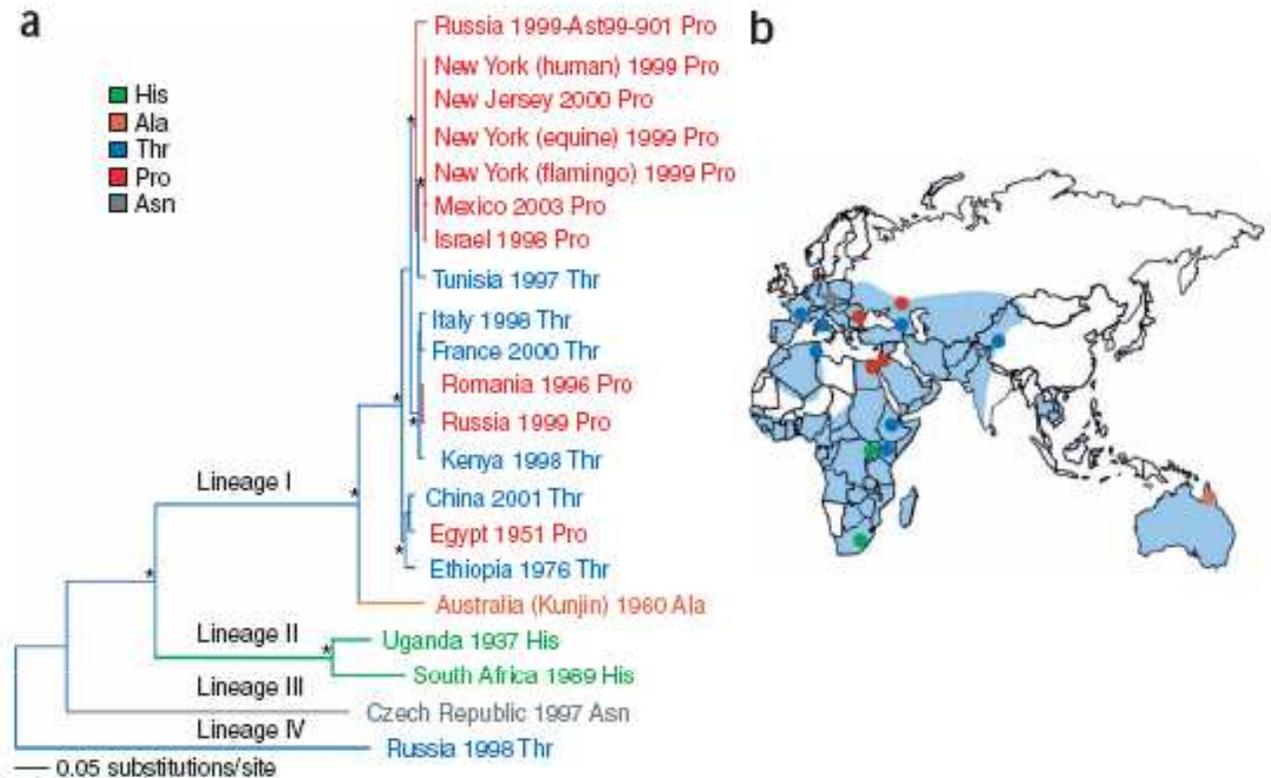
- Ausente hasta 1999
- Relativamente contenido hasta 2002
- Rápida expansión en una extensa zona geográfica
- Muchos miles de casos humanos
- Aves silvestres muy sensibles
- **En América Central y del Sur el avance ha sido más lento y “silencioso” :**
 - ¿patogenicidad en aves?
 - ¿casos humanos? (Mexico).

¿Por qué el WNV afecta tanto en EE.UU. y tan poco en Europa?

- Hipótesis 1: **Virulencia** → El virus americano (NY99) es más virulento que los aislados europeos
- Hipótesis 2: **Vector puente eficaz** → Al contrario de lo que ocurre en EE.UU., en Europa, las especies del complejo *Cx pipiens* parecen dividirse entre ornitófaos y antropófaos (Fonseca et al, Science 2004, 303:1535-8).
- Hipótesis 3: **Inmunidad cross-reactiva** → En Europa existen virus endémicos similares al WNV que inmunizarían de forma natural a las aves expuestas al WNV introducido de forma exógena
- Hipótesis 4: **Resistencia natural** → Las poblaciones de aves europeas, a diferencia de las americanas, han estado expuestas durante largo tiempo a la infección por WNV, lo que ha seleccionado a las poblaciones más resistentes

Mutación T249P

NS3:
 Responsable de la patogenicidad en cuervos americanos (*Corvus brachyrhynchos*)



WNV: patogénesis

- En mamíferos:

- Caballos:

- Un 10% de las infecciones presenta signos clínicos.
- La mortalidad en los casos clínicos es de entre un 20 y un 40%.
- La edad no parece asociada a los casos graves.

- Humanos:

- Infecciones asintomáticas: 90%
- Signos leves: <10%.
- Enfermedad neuroinvasiva: <1%
- Tasa de mortalidad: 2-4% de los casos clínicos.
- Edad avanzada: mayor riesgo de enfermedad grave.

- Ratones:

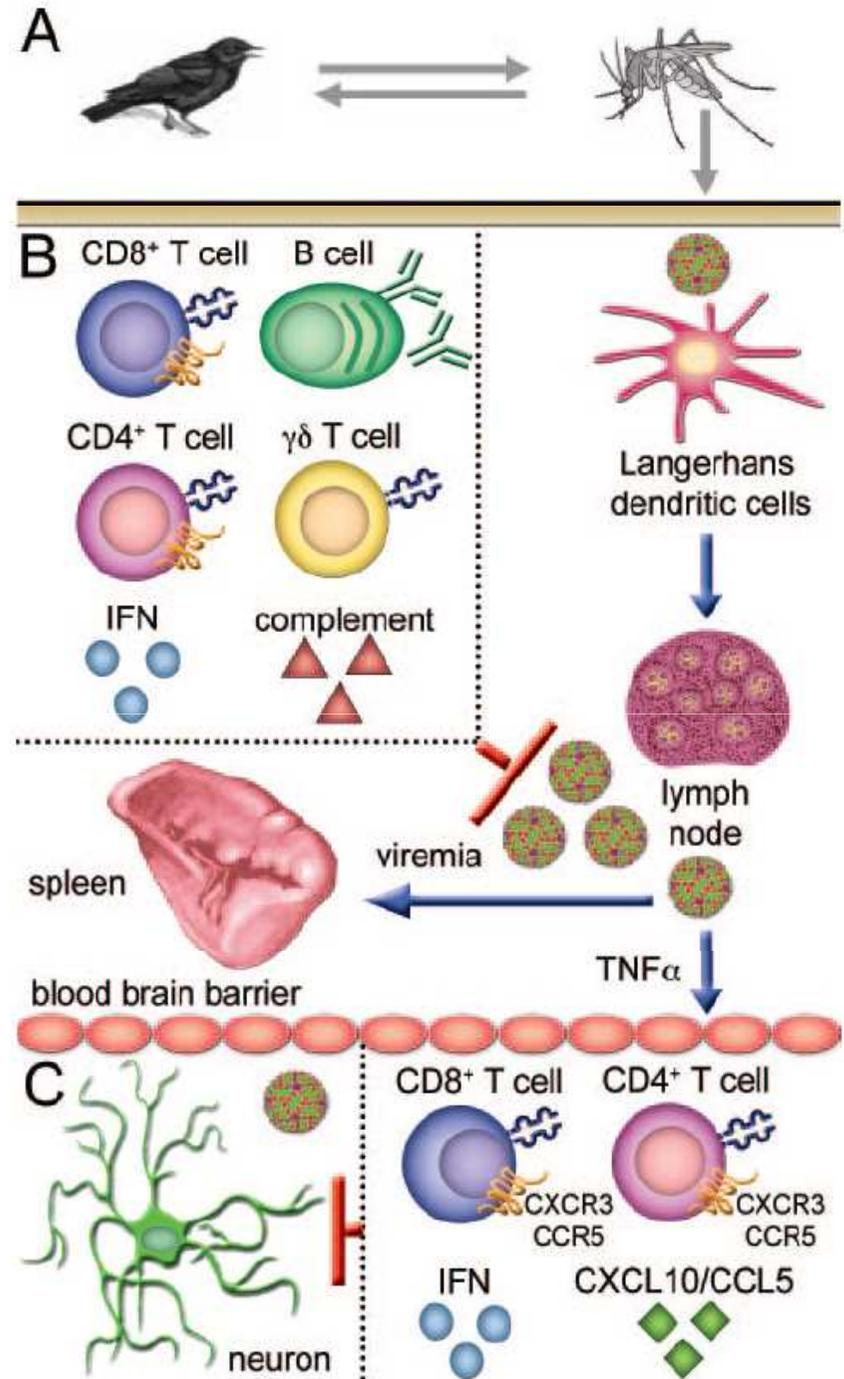
- Mortalidad muy variable, en función de:
 - Cepa de ratón.
 - Cepa de virus.

Incidental
Hosts



WNV: patogénesis

- Tras la inoculación por mosquitos (A), se produce una viremia primaria:
 - Replica en las células de Langerhans (APC, SRE) de la piel.
 - Pasa a los nódulos linfáticos (+ replic).
- Diseminación a otros órganos (B).
 - Mecanismos de respuesta antiviral que limitan la replicación:
 - IFN- α/β .
 - Inmunidad humoral (>>IgM).
 - Complemento.
 - Células T γ/δ secretoras de IFN- γ
 - Inmunidad celular (CD4+ y CD8+).
- Invasión del SNC (C):
 - Atraviesa la barrera hematoencefálica:
 - Permeabilización mediada por TNF- α .
 - Infecta a las neuronas.
 - Mecanismos defensivos a nivel de SNC:
 - IFN- α/β .
 - Reclutamiento de CD4+ y CD8+ por quimiocinas CXCL10/CCL5.



Vigilancia de WNV

