



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DEL VIRUS DEL NILO  
OCCIDENTAL EN LARVAS DE INSECTO: APLICACIÓN DIAGNÓSTICA  
Y CAPACIDAD INMUNOGÉNICA Y PROTECTORA EN EL MODELO  
MURINO

TESIS DOCTORAL

Julio Alonso Padilla

Madrid, 2010





Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

**Obtención de antígenos recombinantes del virus del Nilo Occidental en  
larvas de insecto: aplicación diagnóstica y capacidad inmunogénica y  
protectora en el modelo murino**

**TESIS DOCTORAL**

Julio Alonso Padilla  
Madrid, 2010



Memoria presentada por el Licenciado en Ciencias Biológicas Julio Alonso Padilla para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Octubre de 2010



El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Saiz Calahorra, y financiado por una beca predoctoral de Formación del Personal de Investigación (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación asociada al Proyecto de Investigación AGL-2004-06071.





Todos los procedimientos experimentales que se han realizado en esta Tesis utilizando animales de experimentación han sido aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.



## **Agradecimientos**

Muchas gracias al Dr. Juan Carlos Saiz por su dirección y dedicación, por decir lo que piensa pensando lo que dice, por ser un buen jefe. A la Dra. Estela Escribano por enseñarme a crecer y destruir células, a termociclar, a hacer ELISAs,... y por esas risas cuando comíamos en el rellano de una escalera. Gracias a Laurita por abrir camino, por su sentido del humor, por su presencia. A Nere por ayudarme, por sus ideas, por estar ahí, por su receta para hacer las judías verdes, por su cariño. Tanto amor a los animales, algo tenía que recaer en mí. Muchas gracias a Ana por su actitud, por ser como es, por su capacidad de trabajo, porque ha sido una gran suerte el tenerte de compañera. A Miguel, con el que coincidí menos, porque su tesis me sirvió de referente y porque se quedó con mi sitio. Qué vistas más bonitas cuando la hierba está verde, se pone el sol y los rayos cruzan los pinos.

A María, porque siempre tuvo un momento, por sus consejos científicos, y por sus ganas e iniciativa para organizar eventos, ya fueran bailes country o festivales de comida. A Inma, que nos apadrinó (a Nere y a mí) cuando el Z todavía funcionaba, por su tranquilidad, por su experiencia, por enseñarme a manejar los baculovirus, las células de insecto y a ver qué salía de aquello.

Al Departamento de Biotecnología del INIA. Al Dr. José Ángel Escribano y su grupo por los materiales y reactivos que han posibilitado la realización de la parte artrópoda de esta Tesis. A Mariano por el plásmido inicial. A Silvia y ambas Cármenes, por la ayuda con la purificación de proteínas. A Javi, Benoit y Edu por las células. Al Dr. Rafael Blasco y su grupo por los reactivos y aparatos prestados, entre ellos el mejor sonicador de tip de la planta. A Janin, que me sacó de un bache de digestiones secuenciales, a Paula de voz cristalina y a Miguel, al que nunca gané al tenis por más que lo intenté. A Inmuno, porque siempre que pasé fui bien recibido, y casi siempre era a pedir (cabinas, reactivos, aparatos o títulos de canciones). Gracias a Conchi por su franqueza y su risa sonora que fácilmente se transmite, a Belén, Tere, Paloma, Ana, Elena, Sara, Maite, M<sup>a</sup> Ángeles, María, Blanca, Carmen...oyendo vuestras risas matutinas se diría que tenéis buen despertar. Gracias a Marga por hacernos la vida más fácil y por contarnos chistes. Sobre sistemas de aire acondicionado, lo siento pero no tengo ni idea. Al laboratorio de la Dra. Covadonga Alonso por los materiales prestados y acogernos en el Z, después de atravesar un bosque. A Pepe, que se fue al norte con San Fermín, y a Bruno. A Miguel Ángel, fuente de información de videojuegos y compañero junto con Bárbara de cafés de sobremesa. A Julio Coll, gracias por el lector de ELISAs y por la pecera. A Sandra, que hacía más amenas las salidas al balcón a saludar.

A Ismael y Rodrigo de Algenex, que inocularon las larvas, sustrato de este trabajo.

Gracias a la Dra. Belén Borrego y su gente, Lourdes, Nuria y Paco, por darme cobijo y ayuda cuando iba al CISA. Desayunar en la cafetería café con leche y tostada antes de entrar al P3 era un gusto. Gracias a la Dra. Sevilla por prestarme la jeringa de repetición. Y a Jana por ser la chica más alegre del P3 e invitarme a té y galletas.

Al Dr. Alfonso Gutiérrez y a su grupo en el departamento de Reproducción Animal del INIA, por la ayuda prestada con los cruces de las ratonas y su manipulación.

Gracias a la Dra. Elizabeth Loza, que amablemente nos suministró la colección de sueros equinos de México. Al Dr. Guillermo Estrada y al Dr. Antonio Garmendia por los sueros control.

Al Dr. Philip Dèspres por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y regalarme algunos reactivos valiosos. A la Dra. Eva Mertens, compañera de pupitre, que me ayudó en Paris.

Al Dr. Juan Manuel Ribes por echarme un cable con la estadística.

A mis amigos de Colme, que se alegran cuando sacamos un paper microbiótico. ¿Cuándo nos vamos de vacaciones?

A mi familia, mis hermanas Pilar y Nuria, y mis hermanos Carlos y Javi, porque cuando estoy con vosotros me siento como un niño y las cosas son más sencillas y divertidas. A mis padres, Julio y Pili. Muchas gracias por ser como sois, por la educación, la paciencia, los tapers, el altruismo,...

A Tila que me saca de paseo, y a Sandra por todo, porque también me saca de paseo y de viaje en cuanto puede. Eres la alegría de cada día.

## Abreviaturas

AcM	anticuerpo monoclonal
AcNPV	virus <i>Autographa californica</i> de la polihedrosis nuclear ( <i>Autographa californica</i> nuclear polihedrosis virus)
AcP	anticuerpo policlonal
ADE	aumento de la infección mediada por anticuerpos ( <i>antibody dependent enhancement of infection</i> )
ANOVA	análisis de la varianza ( <i>analysis of variance</i> )
Bac- <i>wt</i>	baculovirus de fenotipo silvestre ( <i>wild type</i> )
BSA	seroalbúmina bovina ( <i>bovine serum albumin</i> )
CCR5	receptor de la quimioquina 5
cDNA	ADN complementario
CF	fijación del complemento ( <i>complement fixation</i> )
C-term	carboxilo terminal
d.e.	desviación estándar
DEPC	deietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxidorribonucleico ( <i>desoxiribonucleic acid</i> )
DTT	ditiotreitrol
ECP	efecto citopático
EDTA	ácido etilén diamino tetraacético
ELISA	ensayo de inmunodetección enzimático ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EMEM	medio Eagle modificado ( <i>Eagle's modified medium</i> )
FAM	6-carboxifluoresceína
g	valor de aceleración de la gravedad
HI	ensayo de inhibición de la hemaglutinación ( <i>hemagglutination inhibition</i> )
HMAH	fluido ascítico de ratón hiperinmune ( <i>hyperimmune mouse ascitic fluid</i> )
i.c.	intracraneal
i.p.	intraperitoneal
IF	inmunofluorescencia
IFA	ensayo de inmunofluorescencia ( <i>immunofluorescence assay</i> )
IFN	interferón

Ig	inmunoglobulina
Ir-Bac	antígeno irrelevante purificado de larvas inoculadas con un baculovirus silvestre
Ir-L	antígeno irrelevante de larvas sin inocular
Ir-Vero	antígeno irrelevante de células Vero
Kb	kilobase
KDa	kilodalton
LCR	líquido cefalorraquídeo
m.d.i	multiplicidad de infección
MCS	sitio de clonaje múltiple ( <i>multiple cloning site</i> )
min	minuto
MWCO	umbral de masa molecular ( <i>molecular weight cut off</i> )
NSB-3	nivel de seguridad biológica 3
nt	nucleótido
N-term	amino terminal
O/N	durante la noche ( <i>overnight</i> )
OAS1b	oligoadenilato sintetasa 1b
OPD	ortofenilendiamina
ORF	pauta de lectura abierta ( <i>open reading frame</i> )
p.b.	pares de bases
p.i.	post-infección
PBS	solución salina tamponada con fosfato ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBST	solución salina tamponada con fosfato con Tween 20 al 0.05%
PCR	reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )
poli(A)	poliadenilato
P <sub>PH</sub>	promotor de la polihedrina
PRNT	ensayo de reducción de la infectividad ( <i>plaque reduction neutralization test</i> )
PS	péptido señal
r.p.m	revoluciones por minuto
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN ( <i>RNA dependent RNA polymerase</i> )
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucleico ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	transcripción inversa ( <i>reverse transcription</i> )
RTG	red del <i>trans</i> -Golgi

s	segundo
SB	solución de bloqueo
SDS	dodecil sulfato sódico ( <i>sodium dodecil sulfate</i> )
SFB	suero fetal bovino
SL	lazo de tallo ( <i>stem loop</i> )
SNC	sistema nervioso central
TAMRA	tetrametilrodamina
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
UFP	unidades formadoras de placa
UTR	región no codificante ( <i>untranslated region</i> )
VDEN	virus del Dengue
VEJ	virus de la encefalitis japonesa
VESL	virus de la encefalitis de San Luis
VETG	virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
VEVM	virus de la encefalitis del valle de Murray
VFA	virus de la fiebre amarilla
VHC	virus de la hepatitis C
VILH	virus Ilheus
VNO	virus del Nilo Occidental
VPPC	virus de la peste porcina clásica





# Índice

<b>1. Resumen en inglés (Summary)</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	5
2.1 Enfermedades emergentes infecciosas .....	5
2.2 Virus del Nilo Occidental (VNO): historia .....	5
2.3 Ecología .....	6
2.3.1 Ciclo de transmisión .....	6
2.3.1.1 Vectores .....	7
2.3.1.2 Hospedadores .....	8
2.3.2 Distribución .....	8
2.3.3 Taxonomía y filogenia .....	11
2.4 Organización genómica .....	12
2.4.1 Regiones no codificantes .....	13
2.4.2 Región codificante .....	14
2.4.2.1 Proteínas estructurales: estructura y morfología de la partícula viral .....	14
2.4.2.2 Proteínas no estructurales .....	16
2.5 Ciclo replicativo viral .....	17
2.6 Dinámica de cuasiespecies .....	18
2.7 Interacción virus-hospedador .....	19
2.7.1 Patogénesis: virus <i>versus</i> células .....	19
2.7.2 VNO y sistema inmune: virus <i>versus</i> organismo .....	19
2.7.3 Epidemiología: virus <i>versus</i> poblaciones .....	21
2.7.3.1 Humanos .....	21
2.7.3.2 Equinos .....	22
2.7.3.3 Aves .....	22
2.8 Diagnóstico .....	23
2.8.1 Detección directa .....	23
2.8.2 Detección indirecta .....	24
2.9 Desarrollo de vacunas y antivirales .....	27

<b>3. Objetivos</b> .....	33
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	37
4.1 Virus .....	37
4.2 Cultivo de células eucariotas .....	37
4.3 Infecciones virales .....	38
4.3.1 Amplificación de VNO: infección en medio líquido.....	38
4.3.2 Titulación de VNO: infección en medio semisólido .....	38
4.3.3 Obtención de virus inactivado (antígeno viral).....	38
4.4 Manipulación de ácidos nucleicos .....	39
4.4.1 Extracción de ARN vírico.....	39
4.4.2 Síntesis y amplificación de ADNc.....	39
4.4.3 RT-PCR a tiempo real.....	41
4.4.4 Cuantificación y purificación de ADN .....	41
4.4.5 Secuenciación de ADN .....	41
4.5 Clonaje molecular.....	41
4.5.1 Obtención de pFastMel-Es-His.....	41
4.5.2 Obtención de pFastMel-DIII-His .....	42
4.6 Generación de los baculovirus recombinantes .....	43
4.6.1 Amplificación de baculovirus recombinantes.....	44
4.6.2 Titulación de baculovirus recombinantes .....	44
4.7 Inoculación de larvas .....	45
4.7.1 Procesamiento de larvas.....	45
4.8 Purificación de proteínas .....	46
4.8.1 Dialización y liofilización de proteínas .....	47
4.9 Ensayos de inmunodetección.....	47
4.9.1 <i>Western blot</i> .....	48
4.9.2 ELISA ( <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ).....	48
4.9.2.1 Criterio de valoración del ELISA.....	49
4.10 Ensayos de inhibición de la hemaglutinación.....	49
4.11 Ensayos de neutralización de la actividad viral.....	50
4.11.1 Ensayos de neutralización <i>in vitro</i> (PRNT).....	50
4.11.2 Ensayos de neutralización <i>in vivo</i> .....	50
4.12 Experimentos con ratones.....	51

4.12.1 Animales .....	51
4.12.2 Inmunizaciones y desafío.....	51
4.12.2.1 Experimento 1: vacunación de ratonas adultas .....	51
4.12.2.2 Experimento 2: estudios de la transmisión pasiva de la inmunidad.....	52
4.12.3 Recolección y procesamiento de muestras .....	52
4.13 Aplicaciones y programas bioinformáticos .....	53
4.14 Métodos estadísticos y análisis de los datos.....	53
4.15 Medios, diluciones y tampones .....	53
<b>5. Resultados .....</b>	<b>59</b>
5.1 Caracterización de una colección de sueros equinos.....	59
5.2 Generación de los baculovirus recombinantes .....	64
5.2.1 Predicciones de secuencia.....	64
5.2.2 Titulación de los baculovirus recombinantes.....	65
5.3 Expresión de las proteínas recombinantes en células de insecto.....	66
5.4 Expresión de las proteínas recombinantes en larvas .....	67
5.5 Determinación de la capacidad antigénica de los extractos crudos.....	67
5.6 Purificación de las proteínas recombinantes .....	70
5.6.1 Detección de las proteínas purificadas.....	74
5.7 Determinación de la capacidad antigénica de las subunidades purificadas.....	75
5.8 Optimización de la concentración de rE y rDIII en ELISA .....	75
5.9 Optimización de la dilución de sueros equinos .....	77
5.10 Validación de las subunidades proteicas como antígenos de ELISA.....	78
5.10.1 Antígeno VNOi.....	79
5.10.2 Antígeno rE.....	79
5.10.3 Antígeno rDIII .....	80
5.11 Conservación de rE.....	82
5.12 Capacidad inmunogénica y protectora en el modelo murino de los antígenos recombinantes generados.....	82
5.12.1 Detección de IgG anti-VNO en ELISA .....	83
5.12.2 Detección de anticuerpos neutralizantes.....	85
5.12.3 Eficacia protectora de las subunidades recombinantes.....	87
5.13 Estudio de las rutas de transmisión de anticuerpos específicos de madres inmunizadas a crías.....	89

5.13.1 Inmunización de las madres.....	89
5.13.2 Efecto protector de rE y rDIII.....	90
<b>6. Discusión.....</b>	<b>97</b>
6.1 Caracterización de una colección sérica equina de México .....	97
6.1.1 La reactividad cruzada de flavivirus: hándicap en el diagnóstico serológico.....	97
6.1.2 Seroprevalencia del VNO en México: expansión de la distribución viral.....	98
6.1.3 Elevada prevalencia, baja incidencia: el VNO en México .....	99
6.2 Selección de las secuencias del VNO a expresar .....	100
6.3 Producción proteica en el sistema de baculovirus .....	101
6.3.1 Expresión en células: secreción de los productos recombinantes.....	102
6.3.2 Expresión en larvas de insecto: purificación parcial de las subunidades .....	102
6.4 Desarrollo de un sistema ELISA para detectar IgG anti-VNO .....	103
6.4.1 Los extractos crudos larvarios como antígenos .....	104
6.4.2 Las proteínas purificadas rE y rDIII como antígenos: validación de los ELISAs basados en subunidades proteicas recombinantes.....	105
6.5 Eficacia protectora de los antígenos recombinantes en el modelo murino.....	107
6.5.1 Vías de transmisión vertical de la inmunidad: intrauterina y transplacentaria .....	109
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>113</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>117</b>
8.1 Páginas web referenciadas en esta Tesis .....	135
<b>9. Anexo .....</b>	<b>139</b>

## **Resumen en inglés (Summary)**



## 1. Resumen en inglés (Summary)

West Nile virus (WNV) is a positive strand RNA enveloped virus (*Flavivirus* genus, *Flaviviridae* family), which is maintained in nature in an enzootic cycle that involves mosquito vectors and birds as primary hosts, but it can also infect other vertebrates, such as humans and horses. Although WNV infection is asymptomatic in the majority of cases, neural tropism of the virus can lead to death or leave severe sequelae especially in immune-suppressed patients.

First isolated in Uganda in 1937, WNV is endemic in regions of Africa, Europe, Asia, Oceania and America and it is therefore the most worldwide distributed flavivirus. Originally associated with a flu-like disease (West Nile fever) with sporadic encephalitic cases reported in the Mediterranean basin, its epidemiology changed in the 1990's, when WNV neurovirulent strains emerged in Tunisia, Romania, Russia and Israel. In 1999, the virus was responsible of an encephalitic outbreak in New York, U.S.A. In a short time, WNV expanded its distribution throughout the American continent, mainly spread by infected migratory birds. The virus continuous expansion emphasizes the need of more efficient and safe diagnostic tools to perform accurate epidemiologic surveillance.

WNV diagnosis is mostly performed serologically as the viremia is short lasting and usually precedes the onset of disease symptoms. Although the reference technique is the plaque reduction neutralization test (PRNT), this is laborious, time-consuming, and implies working with live virus in biosafety level 3 (BSL-3) facilities; therefore several enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) have been developed lately. These allow fast high-throughput results, which can be very helpful to filter off negative samples previous to PRNT confirmation.

In this work, the indirect presence of WNV in horse serum samples collected in the Mexican states of Chiapas and Puebla, where no WNV records existed before, was determined, thus evidencing the virus spread throughout the country. Survey of anti-WNV immunoglobulin in horse sera was achieved by an ELISA based on inactivated virus, PRNT and hemagglutination inhibition (HI) tests. The relative high seroprevalence observed is in agreement with that previously reported in other regions of Mexico.

In order to obtain recombinant non-infectious antigens, WNV envelope protein (E) and its domain III (DIII) were produced in insect larvae (*Trichoplusia ni*) with the recombinant baculovirus technology. After a single purification step both protein subunits were obtained in high yield. An ELISA test based on the recombinant E antigen obtained was developed for WNV diagnosis in serum samples. Results were compared to those obtained with the ELISA based on inactivated virus, which is the standard antigen in most laboratories, and showed a high concordance. The developed assay was further validated to the reference PRNT. In contrast, sensitivity of the recombinant DIII based ELISA was low, minimizing its possible usefulness as diagnostic antigen.

Immunization of mice with any of the recombinant proteins obtained elicited high neutralizing antibody levels that conferred sterile immunity to all vaccinated animals when challenged with a neurovirulent viral strain, in contrast to the morbidity and mortality observed in unimmunized control animals.

Vertical transmission of immunity acquired during pregnancy was also studied, concluding that both trans-placental and breast-feeding routes contributed to protect the offspring from viral challenge.





# **Introducción**



## 2. Introducción

### 2.1 Enfermedades infecciosas emergentes

Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos patógenos y afectan principalmente a los países en vías de desarrollo, constituyendo la primera causa de muerte en el mundo (www.who.int). A pesar de los avances científicos y médicos realizados, la incidencia de estas enfermedades en la salud pública sigue siendo muy elevada.

Según estimaciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), más del 60% de las enfermedades infecciosas conocidas son zoonosis. Ese porcentaje se eleva hasta el 75% en el caso de las enfermedades emergentes, ocasionadas por patógenos no descritos previamente (por ejemplo el virus Nipah). El salto entre especies de los patógenos y su posterior expansión en la población humana se ven favorecidos por factores como el aumento demográfico, la explotación y uso de nuevos territorios, el gran volumen de movimientos de personas y mercancías, el comercio con especies silvestres, etc. (Cutler, Fooks y van der Poel, 2010). Esos factores favorecen igualmente la re-emergencia de patógenos cuya incidencia previa en la salud pública era escasa. En este caso, la propia variabilidad genética de los microorganismos juega un papel importante. La capacidad de cambio genético es especialmente relevante en los virus, que representan el grupo más numeroso de patógenos re-emergentes. Entre éstos, los virus transmitidos por vectores artrópodos, o arbovirus, son responsables de enfermedades de gran impacto en la salud pública como el Dengue, la fiebre amarilla o la encefalitis japonesa.

La expansión de los vectores transmisores favorecida por el calentamiento global (Epstein, 2001; Gould y Higgs, 2009), unido a la creciente exposición a las fuentes de patógenos y la adaptabilidad intrínseca de éstos, han posibilitado la emergencia de brotes epidémicos en regiones donde nunca antes se habían producido (Weaver y Reisen, 2010). Este ha sido el caso del virus del Nilo Occidental (VNO), un virus re-emergente que ha atraído gran interés científico y mediático desde su entrada en EE.UU. en 1999, debido al número de muertes en humanos, equinos y aves que ha ocasionado en este país.

### 2.2 Virus del Nilo Occidental (VNO): historia

El VNO fue aislado por primera vez en Uganda en 1937 a partir de una muestra de suero de una paciente febril (Smithburn *et al.*, 1940). Los autores de este estudio demostraron que se trataba de un agente infeccioso filtrable (virus) que producía gran mortalidad al ser inoculado en ratones de laboratorio, en los que las lesiones se localizaban en el sistema

nervioso central. Los mismos autores describieron también la producción de anticuerpos neutralizantes frente al virus y lo relacionaron con otros agentes neurotrópicos como el virus de la encefalitis japonesa (VEJ) y el virus de la encefalitis de San Luis (VESL).

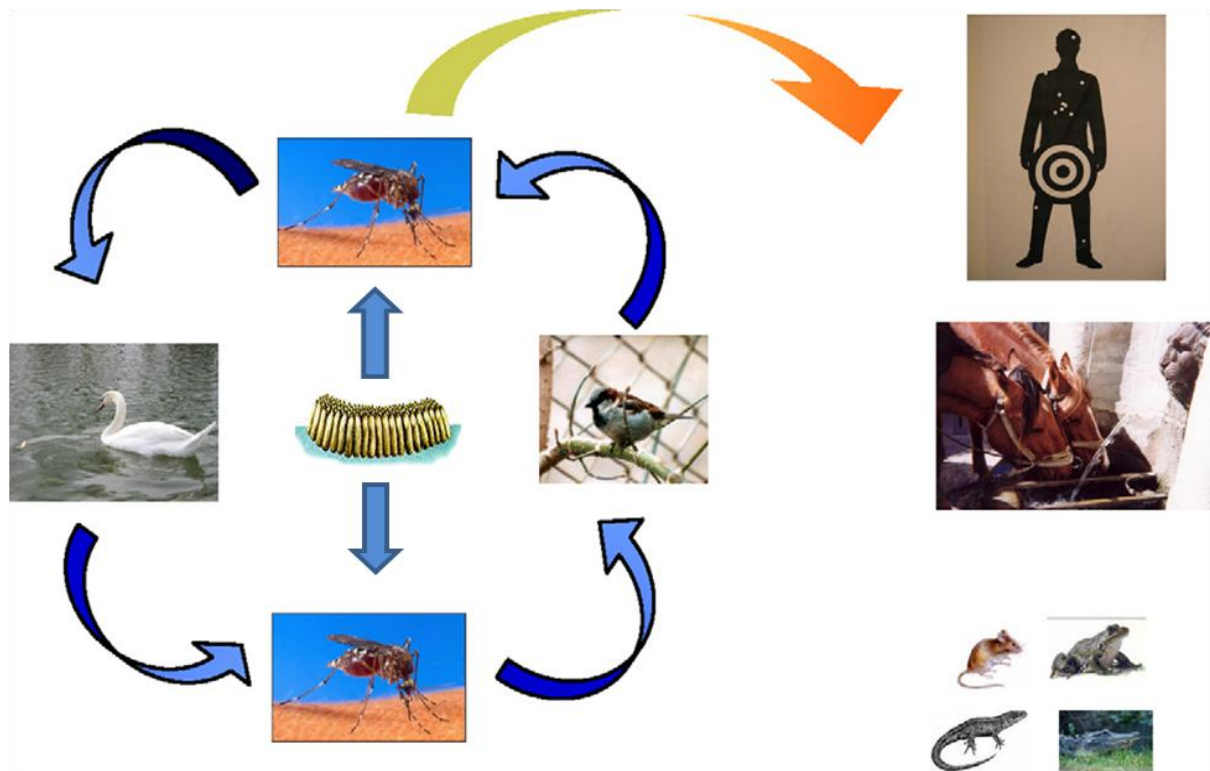
Trabajos posteriores caracterizaron su ecología al ser aislado en humanos, mosquitos y pájaros en Egipto (Hurlbut, 1956; Work, Hurlbut y Taylor, 1955) e Israel (Nir *et al.*, 1968). Posteriormente se demostró que los equinos eran también susceptibles a la infección (Guillon *et al.*, 1968; Schmidt y Elmansoury, 1963).

Hasta mediados de los años 1990 el VNO había causado brotes esporádicos con raros casos de encefalitis en humanos en los países de la cuenca mediterránea (Murgue, Zeller y Deubel, 2002). La infección cursaba con una sintomatología similar a una gripe suave que se denominó fiebre del Nilo. Ese patrón epidemiológico cambió al re-emerger el VNO con virulencia en Túnez (Feki *et al.*, 2005), Rumania (Tsai, 1998), Israel (Bin *et al.*, 2001) y Rusia (Platonov, 2001), causando docenas de muertes por encefalitis. En 1999 fue detectado por primera vez en América como agente etiológico de un brote de encefalitis en la ciudad de Nueva York (Anderson *et al.*, 1999; Lanciotti *et al.*, 1999). La posterior expansión del virus en EE.UU. ha ocasionado ya más de 1.100 muertes entre cerca de 30.000 casos diagnosticados ([www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile)).

## **2.3 Ecología**

### **2.3.1 Ciclo de transmisión**

El virus se mantiene en un ciclo entre las aves silvestres, que son su principal reservorio natural, y los mosquitos vectores (Figura 1). La principal vía de transmisión es a través de la picadura de mosquitos infectados, pero también se han descrito otras formas de transmisión independientes de vector, de manera que el virus se puede adquirir también esporádicamente por: transfusión sanguínea (Pealer *et al.*, 2003); transplante de órganos (Iwamoto *et al.*, 2003; Kleinschmidt-DeMasters *et al.*, 2004); amamentamiento (2002c; Blázquez y Sáiz, 2010); vía transplacentaria (2002a; Cordoba *et al.*, 2007; Blázquez y Sáiz, 2010); ruta oral (Blázquez y Sáiz, 2010; Komar *et al.*, 2003; Odelola y Oduye, 1977); contacto (Banet-Noach, Simanov y Malkinson, 2003; Klenk *et al.*, 2004; Komar *et al.*, 2003; Nir, 1959) y exposición accidental en el laboratorio (2002b).



**Figura 1. Ciclo de transmisión.** El VNO es transmitido a las aves por mosquitos infectados. Otras especies como humanos y equinos son hospedadores accidentales. Adaptada de Dauphin y Zientara (2007).

### 2.3.1.1 Vectores

Los vectores mayoritarios de propagación del virus son los mosquitos, especialmente del género *Culex* (Goddard *et al.*, 2002), aunque se han descrito otras especies de mosquitos que también pueden transmitirlo (Turell *et al.*, 2002). Estudios experimentales estimaron que un mosquito infectado puede inocular entre  $10^4$  y  $10^6$  unidades formadoras de placa (UFP) del VNO por picadura, y que pequeñas dosis ( $10^2$  UFP) son directamente inoculadas en el torrente sanguíneo del huésped (Styer *et al.*, 2007).

Varios trabajos han mostrado que la infección por el VNO en los mosquitos puede ser patogénica, lo que podría alterar la capacidad de transmisión viral de los mismos (Girard *et al.*, 2005; Girard *et al.*, 2007). Por contra, la transmisión viral *trans-ovárica* descubierta entre mosquitos *Culex* en la naturaleza (Baqar *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2000) contribuiría a perpetuar el ciclo de transmisión del VNO. Por otro lado, se ha demostrado otro tipo de transmisión entre vectores mosquitos, independiente de la viremia del hospedador y distinta a la vía *trans-ovárica*. Según ésta, mosquitos no infectados que se alimentan en las cercanías de otros mosquitos infectados pueden infectarse debido a que los virus vertidos localmente por

éstos últimos al picar podrían ser adquiridos por los primeros; incluso a pesar de estar alimentándose de un organismo no infectado o con tasas de viremia bajas (Higgs *et al.*, 2005). Según los autores de estos trabajos, esta forma de transmisión del virus entre vectores podría haber contribuido a la rápida expansión del VNO en Norteamérica (McGee *et al.*, 2007).

El virus también ha sido aislado de garrapatas (Hubálek y Haluzka, 1999) pero, a pesar de que se han realizado infecciones experimentales de varias especies tratando de avalar su importancia como vectores en el ciclo de transmisión (Formosinho y Santos-Silva, 2006; Lawrie *et al.*, 2004), su competencia en el mismo no ha podido ser demostrada (Reisen *et al.*, 2007).

### **2.3.1.2 Hospedadores**

Las aves silvestres son el principal hospedador y reservorio natural del VNO. También se considera que representan una de las principales vías de expansión de la distribución viral debido a las largas distancias que pueden cubrir en sus migraciones (Reed *et al.*, 2003). Su competencia en el ciclo de transmisión viral se debe a la elevada y duradera viremia que pueden alcanzar (Komar, 2003). Hasta la fecha, se han descrito 326 especies de aves susceptibles a la infección ([www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/birdspecies.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/birdspecies.htm)). La susceptibilidad varía de unas familias a otras, siendo los córvidos los más afectados (Komar *et al.*, 2003). Además, se ha descrito que las aves infectadas pueden exudar grandes cantidades de virus a través de la cloaca y las fosas nasales lo que permite el contagio por contacto en ausencia de vector (Dawson *et al.*, 2007; Komar *et al.*, 2002).

Cuando mosquitos infectados se alimentan de otros vertebrados, como équidos y humanos, estos pueden ser también infectados (Blitvich, 2008). Debido al rango de infección múltiple del VNO se han descrito otros muchos hospedadores susceptibles a la infección (revisado en van der Meulen, Pensaert y Nauwynck, 2005). En general, en estos hospedadores secundarios los niveles de virus que se alcanzan en sangre no son lo suficientemente elevados como para que el ciclo de transmisión continúe a partir de ellos.

### **2.3.2 Distribución**

El VNO es endémico en regiones de África, Asia occidental, Europa, América y Oceanía (Figura 2), donde el virus Kunjin es considerado como una cepa del mismo (Hall, Scherret y Mackenzie, 2001). Se trata por tanto del arbovirus más ampliamente distribuido a nivel mundial (Blitvich, 2008).

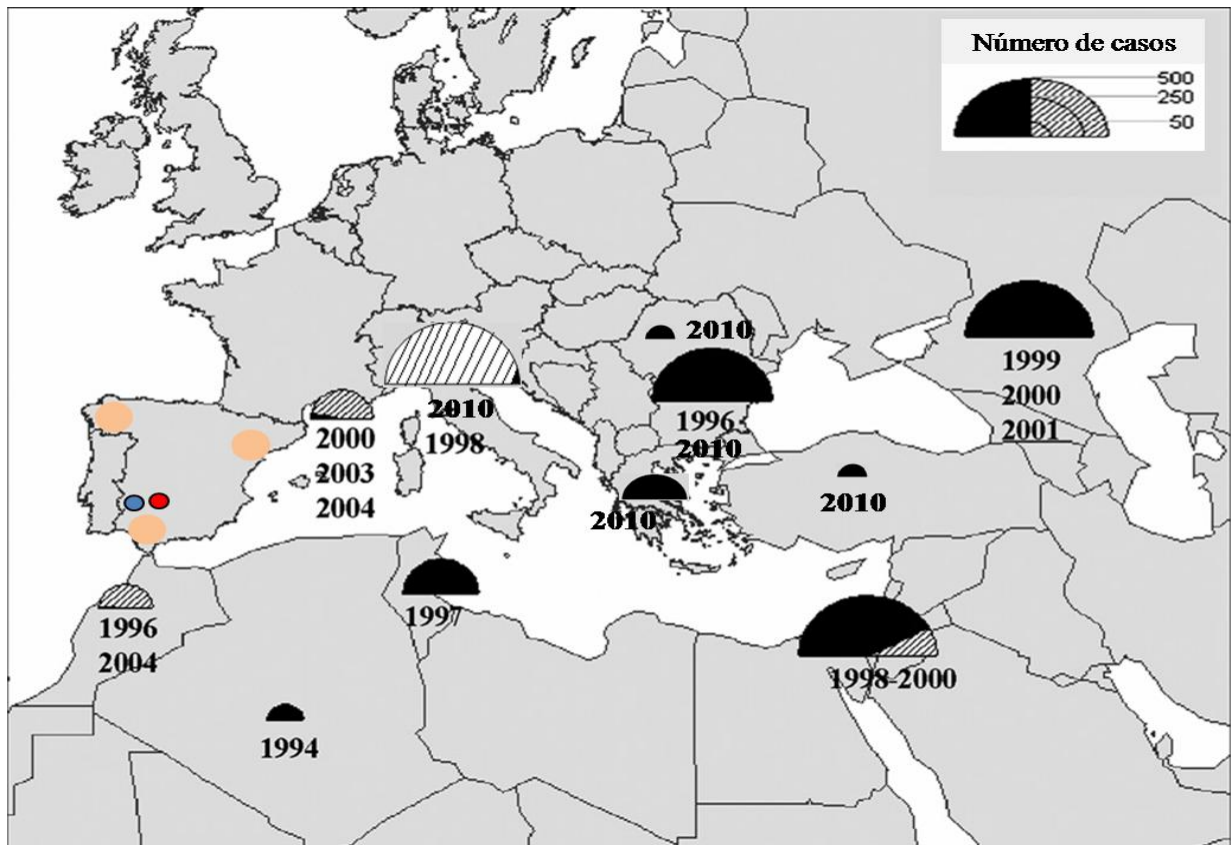


**Figura 2. Distribución mundial del VNO.** Se observa que salvo en la Antártida (no aparece en la imagen) el virus ha sido detectado en regiones de los otros cinco continentes. Figura adaptada de [www.microbeworld.org](http://www.microbeworld.org).

Un hecho a destacar es la rápida expansión del virus en América desde su primera detección en Nueva York en 1999 (Anderson *et al.*, 1999; Lanciotti *et al.*, 1999). En pocos años el virus expandió su distribución a Centroamérica y las Antillas (Estrada-Franco *et al.*, 2003; Morales-Betoulle *et al.*, 2006; Pupo *et al.*, 2006) y Sudamérica (Bosch *et al.*, 2007; Mattar *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2006).

En la región mediterránea la circulación del VNO está documentada desde la década de los años 1950, pero fue a finales del siglo pasado cuando los brotes en equinos y humanos en la región se hicieron más numerosos (Murgue, Zeller y Deubel, 2001). Más recientemente, en 2008, se describieron casos de fiebre del Nilo en humanos y caballos en Italia, Hungría y Rumanía (Calistri *et al.*, 2010), y este mismo año 2010 se están describiendo casos humanos en Grecia, Rumanía, Hungría y Turquía, con más de 250 casos confirmados en el laboratorio y, al menos, 27 muertes ([www.ecdc.europa.eu/](http://www.ecdc.europa.eu/)). En España, lugar de tránsito de múltiples especies de aves en ruta hacia o desde África, lugar de origen y endémico para el VNO, la presencia indirecta del mismo se había detectado en habitantes del Noroeste peninsular en la década de 1970 (Garea González y Filipe, 1977). Estudios más recientes de prevalencia serológica en

humanos residentes en zonas próximas a las desembocaduras de los ríos Ebro (Bofill *et al.*, 2006; Lozano y Filipe, 1998) y Guadalquivir (Bernabeu-Wittel *et al.*, 2007) confirmaron esos resultados (Figura 3). Recientemente, otros estudios con muestras séricas obtenidas de aves en la zona del Parque Nacional de Doñana han demostrado la presencia de anticuerpos neutralizantes frente al VNO (Figuerola *et al.*, 2008), cuya introducción y prevalencia en la zona dependería de aves infectadas provenientes de África (Lopez *et al.*, 2008). En 2007 se describió el que probablemente es el primer caso humano de enfermedad por fiebre del Nilo en nuestro país (Kaptoul *et al.*, 2007), pero el virus no pudo ser aislado. Ese mismo año se consiguió el primer aislado viral de un águila real (*Aquila chrysaetos*) en Ciudad Real (Jimenez-Clavero *et al.*, 2008).



**Figura 3. Distribución de los brotes epidémicos/epizoóticos por VNO ocurridos en Europa y la cuenca Mediterránea desde 1994.** Los semicírculos representan el número de casos equinos (relleno rayado) y/o humanos (relleno negro) registrados en los distintos países. En la figura también se muestran las detecciones del VNO en España: los círculos naranjas indican las regiones con serología positiva en humanos y aves; el círculo azul indica el supuesto caso de enfermedad por el VNO en humano (2007); el círculo rojo indica el primer aislado viral en águila real (2007). Adaptada de Dauphin y Zientara (2007).



### 2.3.3 Taxonomía y filogenia

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus ([www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org)) clasifica el VNO en el género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, junto a otras 52 especies víricas, muchas de ellas patógenos humanos de gran impacto en la salud pública, como el virus de la fiebre amarilla (VFA), que da nombre al género y a la familia, los virus Dengue (DEN), el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (VETG) y el virus de la encefalitis japonesa (VEJ). Estudios antigénicos y moleculares incluyen al VNO en el serocomplejo de este último (Tabla I), al que también pertenecen el virus de la encefalitis de San Luis (VESL) y el virus de la encefalitis del valle de Murray (VEVM) (Roehrig, 2003).

**Tabla I. Serocomplejo del virus de la encefalitis japonesa (VEJ).** Adaptada de Blitvich (2008).

Virus	Reservorio natural	Patógeno humano	Patógeno animal	Distribución geográfica
Cacipacore	Aves	Sí	No	América del Sur
Encefalitis japonesa	Aves, cerdos	Sí	Sí, cerdos y equinos	Asia, Australia
Koutango	Roedores	Sí	-	África
Encefalitis del valle de Murray	Aves	Sí	¿Equinos? <sup>1</sup>	Australia
Encefalitis de San Luis	Aves	Sí	-	Américas y Caribe
Usutu	Aves	-	Aves	África, Europa
Virus del Nilo Occidental	Aves	Sí	Aves y equinos	África, Asia, Europa, Australia, Américas
Yaoundé	Roedores, aves	-	-	África

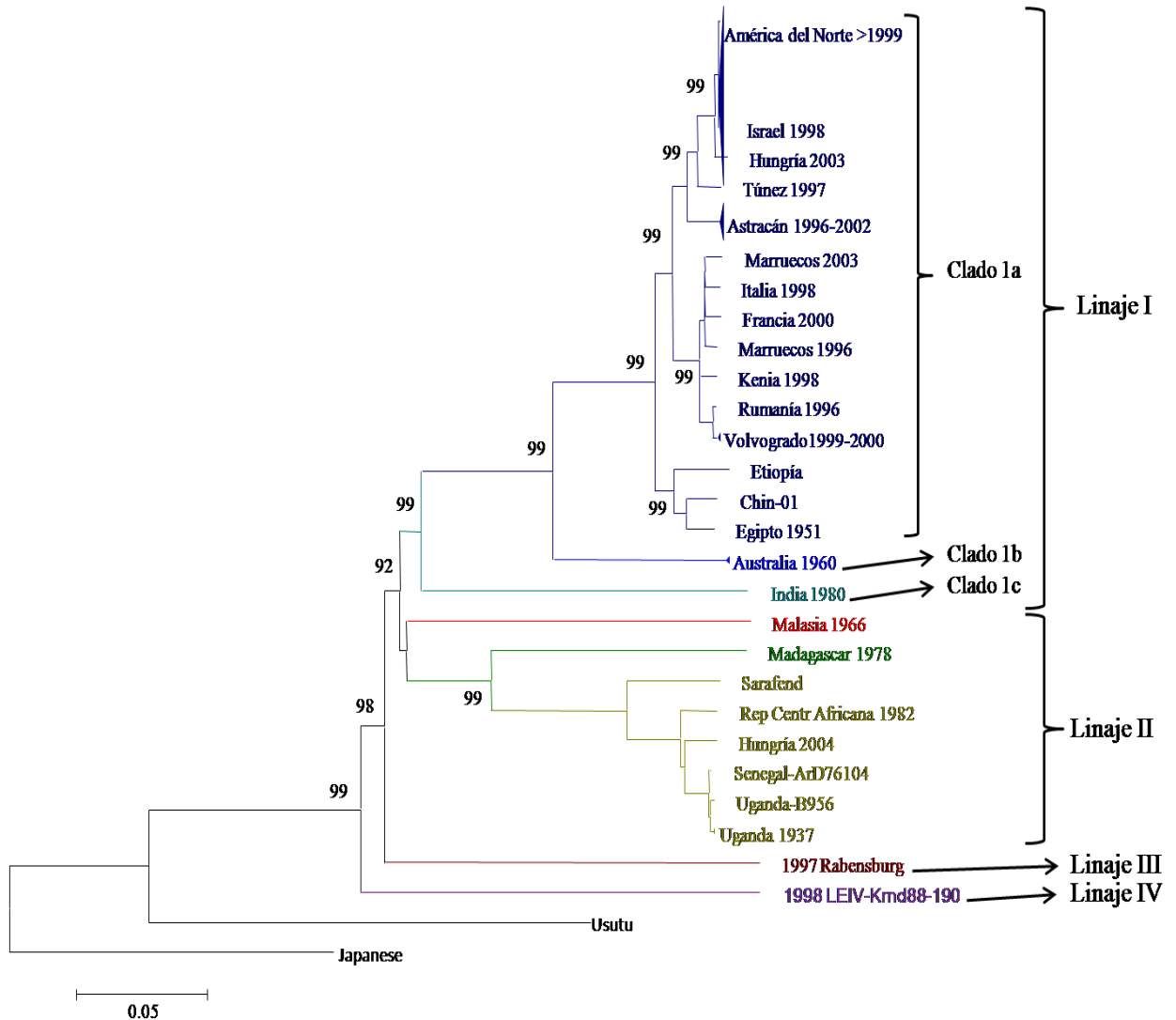
<sup>1</sup>Evidencia anecdótica

Otros dos géneros forman parte de la familia *Flaviviridae*: *Hepacivirus*, con el virus de la hepatitis C (VHC) como único representante, y *Pestivirus*, compuesto por cuatro especies (p.ej.: virus de la peste porcina clásica, VPPC) ([www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org)).

Estudios de secuenciación y filogénesis clasifican las cepas del VNO en dos linajes: I y II (Lanciotti *et al.*, 1999). El linaje I incluye aislados distribuidos a nivel mundial, tanto cepas atenuadas, como la mayoría de cepas caracterizadas en los brotes de encefalitis humanas y equinas de los últimos años. Este linaje ha sido subdividido en tres clados (Lanciotti *et al.*, 2002). En el clado 1a se encuentran aislados de África, Europa, Asia y América. El 1b consiste en los virus Kunjin de Oceanía y el 1c está compuesto por aislados de India. Los aislados de linaje II se consideraban tradicionalmente asociados con infecciones asintomáticas y restringidos al África sub-sahariana y Madagascar; pero recientemente se han identificado aislados virulentos de este linaje en caballos en Sudáfrica (Venter *et al.*, 2009) y en aves en Europa (Bakonyi *et al.*, 2006; Erdelyi *et al.*, 2007).

Los aislados del VNO obtenidos en la República Checa y en la región del Cáucaso han sido propuestos como representantes de un tercer y un cuarto linaje (Bakonyi *et al.*, 2005)

(Figura 4). En otro estudio se sugiere incluso un quinto linaje formado por aislados de la India (Bondre *et al.*, 2007). Recientemente, se ha propuesto que un aislado viral detectado en un *pool* de mosquitos capturados en el sur de España pertenece a un nuevo linaje (Vázquez *et al.*, 2010). En cualquier caso, la existencia de estos nuevos linajes debe ser aun confirmada.

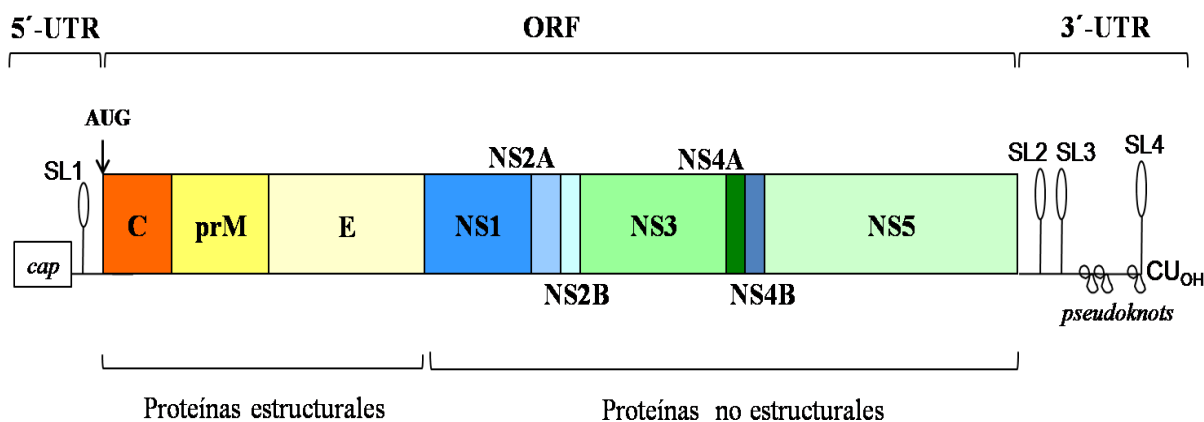


**Figura 4.** Árbol filogenético de VNO establecido a partir de genomas completos. Figura cedida por el Dr. A. Tenorio.

## 2.4 Organización genómica

El genoma del VNO está compuesto por una cadena simple de ARN lineal de polaridad positiva de aproximadamente 11.000 nucleótidos. En concreto el aislado utilizado en esta Tesis tiene 11.029 nt de longitud (ver apartado 4.1). El genoma está compuesto por una región central que contiene una única pauta de lectura abierta (del inglés, *open reading frame*, ORF) de

10.301 nt. La región codificante está flanqueada por dos regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' que se denominan 5'-UTR y 3'-UTR, del inglés *untranslated region*, (Figura 5).



**Figura 5. Organización genómica del VNO.** El marco de lectura abierto (ORF) codifica diez proteínas virales (representadas en cajas). Las proteínas estructurales se localizan hacia la región 5' y las no estructurales hacia la región 3'. El ORF está flanqueado por dos regiones no codificantes (UTR). En el extremo 5'-terminal el genoma tiene una estructura *cap*. En ambas regiones terminales UTR se indican las estructuras terciarias (SL) del ARN.

#### 2.4.1 Regiones no codificantes

Ambas regiones UTR presentan estructuras muy conservadas que están implicadas en los procesos de traducción y replicación del genoma (Brinton, 2002). La región 5'-UTR tiene 96 nt de longitud. Posee una estructura *cap* m<sup>7</sup>GpppAmp en su extremo (Ray *et al.*, 2006) y un *stem loop* (SL1 en la figura 5). La integridad del SL1 es fundamental para la replicación viral (Dong, Zhang y Shi, 2008; Li *et al.*, 2009). En la región 3'-UTR, de 631 nt de longitud, se han identificado tres estructuras *stem loop* (Brinton, 2002) (SL2, SL3 y SL4 en la figura 5). Secuencias conservadas en los *loops* de las dos primeras interactúan de forma terciaria (*pseudoknot*) con secuencias conservadas situadas más hacia el extremo 3' del genoma, plegando la molécula de ARN. Un tercer *pseudoknot* se formaría justo al comienzo del tallo del último y más grande *stem loop* (SL4), con el que interactúan varias proteínas celulares (Blackwell y Brinton, 1995). En el extremo de la región 3'-UTR se encuentra la secuencia CU<sub>OH</sub> (Brinton, 2002), ya que los Flavivirus carecen de poli(A) (Wengler, 1981). La circularización del genoma, necesaria para la traducción y replicación del mismo, se produciría mediante interacciones ARN de larga distancia entre secuencias complementarias situadas en ambos extremos (Zhang *et al.*, 2008).

## 2.4.2 Región codificante

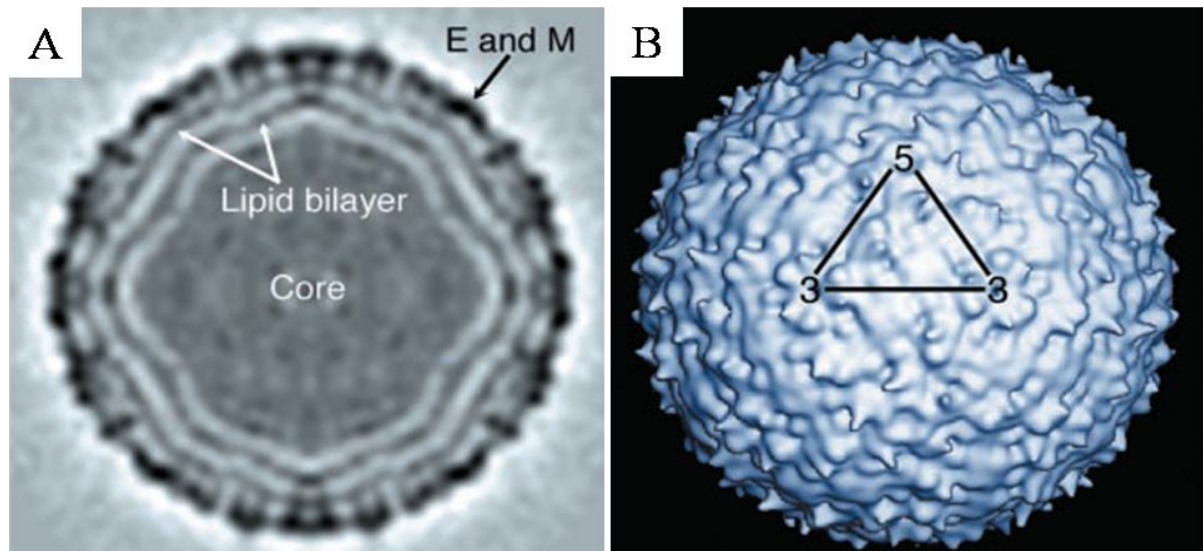
El marco de lectura abierto codifica una poliproteína cuyo procesamiento proteolítico da lugar a diez proteínas virales maduras (Brinton, 2002). Las tres proteínas estructurales (apartado 2.4.2.1) son codificadas en el tercio 5' de ORF y las siete no estructurales (apartado 2.4.2.2) hacia la región 3' (Figura 5).

### 2.4.2.1 Proteínas estructurales: estructura y morfología de la partícula viral

Las tres proteínas estructurales son la proteína de la cápsida (C), la proteína pre-membrana (prM) y la proteína de la envuelta (E).

Múltiples copias de la proteína C (~ 14 KDa) rodean el genoma viral protegiéndolo y formando la nucleocápsida o *core* de aproximadamente 25 nm de diámetro (Figura 6A) (Mukhopadhyay *et al.*, 2003). La estructura atómica de C se ha determinado mediante difracción de rayos X (Dokland *et al.*, 2004). En ella se localiza una de las secuencias implicadas en el proceso de circularización del ARN viral (Brinton, 2002). La proteína C es necesaria para el ensamblaje de la partícula viral (Brinton, 2002) y durante el proceso infeccioso puede inducir apoptosis (Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2008).

Tanto la proteína prM (~ 19 KDa) como la E (~ 55 KDa) son proteínas integrales de membrana que están embebidas en la membrana lipídica que envuelve la nucleocápsida gracias a regiones hidrofóbicas en sus extremos C-terminales, mientras que sus dominios hidrofílicos quedan expuestos hacia el exterior de la partícula viral. En la partícula viral inmadura la prM y la E forman heterodímeros (prM-E). Durante el proceso de maduración de la partícula viral pasan a ser homodímeros de E, al ser digerida la prM. Esta proteína estaría implicada en prevenir un cambio conformacional temprano de E en el tránsito de la partícula inmadura desde el interior celular al exterior (ver más abajo, apartado 2.5), así como en el proceso de ensamblaje de la partícula viral (Tan *et al.*, 2009). Mediante microscopía electrónica se ha demostrado que la partícula viral madura adquiere una conformación casi icosaédrica de unos 50 nm de diámetro en la que no sobresalen espículas y donde 180 copias de E forman una balsa que rodea la envuelta viral (Figura 6B) (Mukhopadhyay *et al.*, 2003).



**Figura 6. Estructura del VNO determinada por crio-microscopía electrónica.** Figura adaptada de Mukhopadabay *et al.* (2003).

A) Sección central que muestra las distintas capas de densidad: la membrana lipídica (*lipid layer*) con las proteínas E y M embebidas y el *core*, formado por repeticiones múltiples de la proteína C.

B) Vista de la superficie del virus. Se muestran los ejes de simetría.

La proteína E está involucrada en los procesos de reconocimiento celular de la partícula viral y en la interacción virus-célula que lleva a la entrada y posterior desencapsidación del virus en el citoplasma celular (Brinton, 2002). Dependiendo de qué cepa viral se trate puede o no estar glicosilada. Al encontrarse glicosilada en los recientes aislados neurovirulentos de linaje I, esta característica se ha considerado un determinante de neurovirulencia (Beasley *et al.*, 2005; Shirato *et al.*, 2004). Sin embargo, otros estudios plantean que otros factores pueden determinar la neurovirulencia independientemente del estado de glicosilación de E (Chambers *et al.*, 1998; Hanna *et al.*, 2005). Además, en otro trabajo se ha propuesto una función inmunomoduladora de la proteína E que afectaría a la respuesta innata, sugiriendo que los diversos perfiles de glicosilación de la proteína servirían al virus para evadir los mecanismos antivirales de los distintos huéspedes durante su ciclo de replicación (Arjona *et al.*, 2007). La estructura atómica de la proteína E de dos aislados virales distintos se ha determinado mediante cristalografía de rayos X (Kanai *et al.*, 2006; Nybakken *et al.*, 2006). Al igual que en las proteínas de la envuelta de otros flavivirus cuya estructura atómica se había definido previamente (Modis *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 1995), en la del VNO se diferencian tres dominios (Nybakken *et al.*, 2006). El dominio I (DI) está formado por un barril- $\beta$  de 8 láminas y hace de “bisagra” articulando los otros dos. El dominio II (DII) formado por 12 cadenas estructuradas

en un barril- $\beta$ , está involucrado en la dimerización de E y contiene un “bolsillo” hidrofóbico fundamental en el proceso de fusión de las membranas de la célula y el virus (Nybakken *et al.*, 2006). El dominio III (DIII) tiene una conformación similar a la de una inmunoglobulina y contiene el sitio de reconocimiento y unión al receptor celular específico, por lo que los epítomos neutralizantes más potentes se localizan en esta región (Mehlhof y Diamond, 2008). La estructura del DIII se ha determinado mediante resonancia magnética nuclear (Volk *et al.*, 2004) y difracción de rayos X (Nybakken *et al.*, 2005). Dado que es la región de la proteína E que más cambia de unos flavivirus a otros se ha planteado su uso como antígeno alternativo para elaborar sistemas de serodiagnóstico específicos (Beasley *et al.*, 2004b) (ver apartado 2.8.2).

#### **2.4.2.2 Proteínas no estructurales**

Las siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) están implicadas, en mayor o menor medida, en la replicación del genoma viral y la modulación de la respuesta inmune del huésped (Brinton, 2002).

Las cuatro proteínas “pares” son de pequeño tamaño y ricas en dominios hidrofóbicos. La NS2A (~ 25 KDa) es una proteína transmembrana que forma parte del complejo de replicación y posee la capacidad de inhibir la respuesta antiviral basada en interferón alfa/beta (IFN $\alpha/\beta$ ) (Liu *et al.*, 2006). Está además relacionada con el ensamblaje de la partícula viral al inducir la formación de membranas en la célula infectada (Leung *et al.*, 2008). La NS2B (~ 14 KDa) es un cofactor de la serina-proteasa viral (NS3) a través de un motivo hidrofílico (Chappell *et al.*, 2008a; Wengler *et al.*, 1991), mientras que por sus regiones hidrofóbicas interacciona con membranas celulares (Brinton, 2002). La NS4A (~ 16 KDa) es también un cofactor de la NS3 (Shiryaev *et al.*, 2009). El péptido 2K, que une la NS4A y la NS4B (~ 27.6 KDa), así como la región C-terminal de la segunda, intervienen en la replicación viral (Mertens *et al.*, 2010; Puig-Basagoiti *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2009). Otra función de la NS4B es inhibir la señalización intracelular del IFN $\alpha/\beta$  (Muñoz-Jordán *et al.*, 2005).

Las proteínas “impares” son de mayor tamaño. La NS1 es una glicoproteína de unos 40 KDa relacionada con la síntesis de la hebra negativa de ARN en los procesos tempranos de la replicación viral (Brinton, 2002). Es secretada durante la fase aguda de la infección por lo que podrían establecerse sistemas de diagnóstico basados en su detección en el suero de animales infectados (Chung y Diamond, 2008; Macdonald *et al.*, 2005). Al ser una proteína secretada, varios estudios han indagado en su posible función moduladora del sistema inmune del huésped (Chung *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2008).

Las proteínas NS3 (~ 69 KDa) y NS5 (~ 104 KDa) son las más relevantes en la replicación viral. Ambas son enzimas multifuncionales e interaccionan para permitir la coordinación entre las actividades enzimáticas que catalizan (Brinton, 2002). En el tercio N-terminal de la NS3 se localiza la serina-proteasa viral, que sólo es activa unida a su cofactor NS2B (Wengler *et al.*, 1991). La importancia de la proteasa en el ciclo replicativo del VNO la convierte en una diana frente a la que desarrollar antivirales (revisado en Chappell *et al.*, 2008b), a lo que contribuye que su estructura atómica haya sido definida (Erbel *et al.*, 2006; Robin *et al.*, 2009). La NS3 en su región C-terminal posee también otras dos actividades enzimáticas: NTPasa y ARN-helicasa (Borowski *et al.*, 2001; Chernov *et al.*, 2008; Mertens *et al.*, 2010). La actividad ATPasa de la helicasa estaría regulada por la NS4A (Shiryaev *et al.*, 2009). Al igual que la proteína de la cápsida (C, apartado 2.4.2.1), la NS3 está involucrada en la inducción de apoptosis (Ramanathan *et al.*, 2006).

La NS5 está situada en el extremo C-terminal de la poliproteína viral. Posee dos actividades catalíticas: metil-transferasa en su porción amino terminal y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) en su región carboxilo terminal. La estructura atómica de ambas regiones ha sido determinada (Malet *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007), lo que podría facilitar el desarrollo de moléculas antivirales (Malet *et al.*, 2008). Un trabajo reciente muestra la intervención de la NS5 en la inhibición de la respuesta inducida por IFN de tipo I (Laurent-Rolle *et al.*, 2010).

## 2.5 Ciclo replicativo viral

El VNO es capaz de replicar en una gran cantidad de cultivos celulares, pero no causa efecto citopático evidente en todos ellos. Se han descrito dos rutas de entrada del virus en la célula: endocitosis mediada por receptor (integrina  $\alpha_v\beta_3$ ) en vesículas revestidas de clatrina (Chu y Ng, 2004a; Chu y Ng, 2004b) o independiente de receptor, a través de microdominios de membrana ricos en colesterol o *lipid-rafts* (Medigeschi *et al.*, 2008). La liberación de la nucleocápsida en el citoplasma es un proceso dependiente de pH (Stiasny y Heinz, 2006). El genoma viral es liberado y traducido en una poliproteína, cuya digestión por la proteasa viral NS2B-NS3 y otras proteasas celulares (Gilfoyl, Fayzulín y Mason, 2009) rinde las distintas proteínas estructurales y no estructurales (apartados 2.4.2.1 y 2.4.2.2). La replicación del ARN viral se lleva a cabo en el citoplasma de la célula infectada en complejos de membranas inducidos por las proteínas virales (Brinton, 2002), aunque también se ha localizado el complejo replicativo formado por NS3-NS5 en el núcleo celular (Uchil, Kumar y Satchidanandam, 2006). La RdRp (NS5) junto con otras proteínas no estructurales y proteínas

celulares sintetiza la hebra negativa (ARN-) complementaria al genoma viral y, a partir de ésta, genera nuevos genomas virales (ARN+). La replicación es semiconservativa y asimétrica, de forma que la síntesis de ARN genómico se ve favorecida (Chu y Westaway, 1985).

Como se ha comentado anteriormente, el ARN genómico actúa como mensajero y es traducido a partir de *cap*. Una vez se han generado suficientes copias de las proteínas estructurales se lleva a cabo el ensamblaje de las partículas virales nacientes. Este proceso se localiza en membranas del retículo endoplasmático rugoso cuya proliferación se observa en células infectadas (Lindenbach y Rice, 2001). Para el ensamblaje son fundamentales las proteínas estructurales C y prM (apartado 2.4.2.1). La estructura de las partículas inmaduras es muy diferente a la de las maduras (Zhang *et al.*, 2007). Los viriones inmaduros que se acumulan en vesículas en la red del *trans*-Golgi (RTG) contienen heterodímeros prM-E, posiblemente para evitar que la proteína E se fusione prematuramente a membranas en su tránsito por los compartimentos ácidos de la célula (Heinz *et al.*, 1994a; Heinz *et al.*, 1994b). Durante la transición hacia el exterior, la región hidrofílica N-terminal de la prM es digerida por una furina (Wengler, 1989) permitiendo que la E adquiera su conformación final y se asocie en homodímeros. Los viriones son finalmente liberados al exterior por exocitosis.

## 2.6 Dinámica de cuasiespecies

El VNO, como la mayoría de virus ARN, se caracteriza por presentar poblaciones virales con una elevada diversidad genética. Las poblaciones del VNO son distribuciones dinámicas complejas de mutantes relacionados entre sí denominadas cuasiespecies virales (Domingo *et al.*, 2006). En estas poblaciones existe un complejo equilibrio entre una elevada tasa de mutación, inherente a las mutaciones introducidas durante la replicación del ARN, y una continua competición reflejada en el mantenimiento de la eficacia biológica (*fitness*). En el caso del VNO esta eficacia está determinada por la naturaleza de los distintos hospedadores del ciclo viral.

Apenas unos pocos trabajos han evaluado la importancia del espectro de mutantes del VNO en la adaptación y el *fitness* viral. Cambios fenotípicos, como la adaptación a distintos cultivos celulares implican cambios genéticos mínimos (Ciota *et al.*, 2007), estando relacionado el aumento de la capacidad replicativa con un espectro de mutantes más amplio (Ciota *et al.*, 2007). La estructura de cuasiespecies confiere una gran flexibilidad adaptativa a los virus ARN (Domingo y Holland, 1997), lo que podría contribuir a explicar la rápida colonización y expansión del virus en América, donde ha tenido que adaptarse a nuevos vectores y hospedadores.



## **2.7 Interacción virus-hospedador**

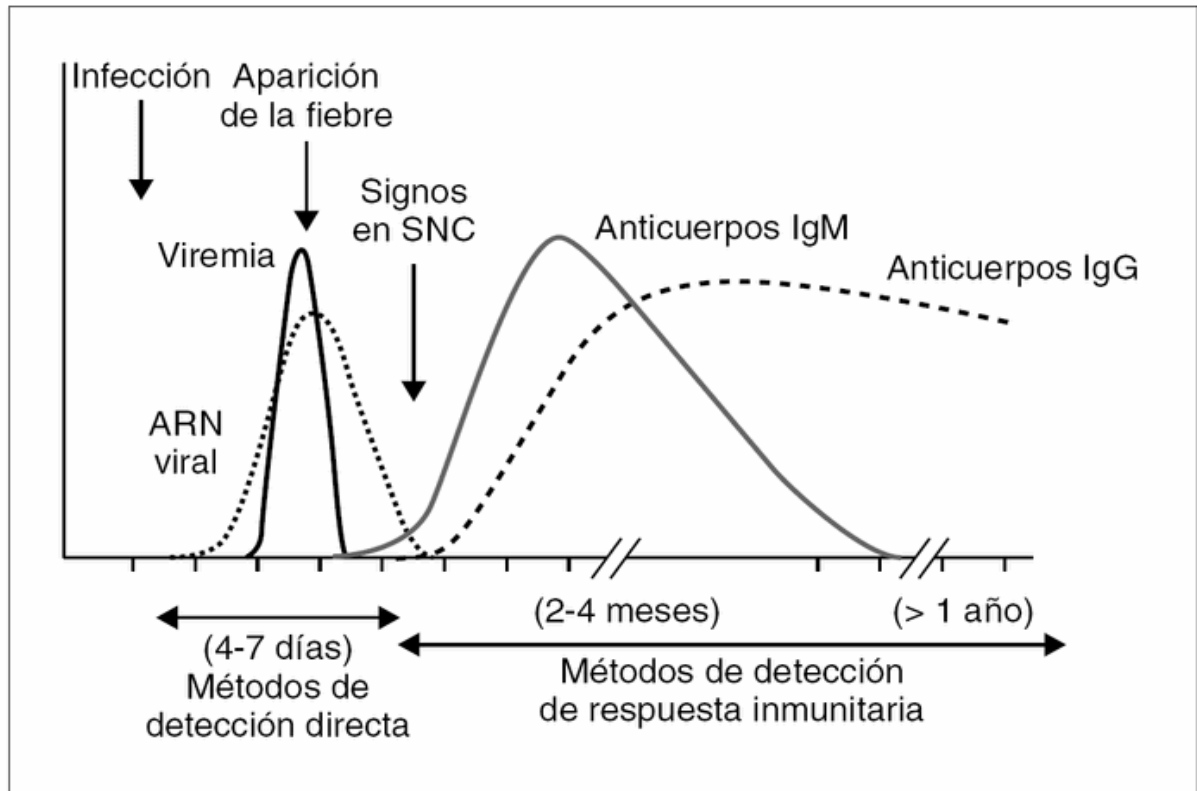
### **2.7.1 Patogénesis: virus *versus* células**

Aves, equinos, humanos y otros vertebrados son susceptibles a la infección por el VNO (Blitvich, 2008). Entre éstos se encuentran la mayoría de cepas de ratones de laboratorio que expresan una forma truncada de la enzima oligoadenilato sintetasa 1b (Oas-1b), implicada en la ruta de respuesta antiviral por interferón (Mashimo *et al.*, 2002; Pereygin *et al.*, 2002; Samuel, 2002). La patología de la infección del sistema nervioso central (SNC) observada en roedores es muy parecida a la que se da en humanos, por lo que ratones y hámsteres son buenos modelos de experimentación para este virus (Nalca, Fellows y Whitehouse, 2003; Xiao *et al.*, 2001). La obtención de ratones *knock-out* ha ayudado a comprender los mecanismos de patogénesis y diseminación viral, así como la interacción entre el virus y los diversos brazos de la respuesta inmune (Samuel y Diamond, 2006; Wang y Fikrig, 2004).

Se ha postulado que el virus replica en el sitio epidérmico de inoculación, en células de Langerhans y migra en éstas hacia los nódulos linfáticos (Byrne *et al.*, 2001). Desde los nódulos pasa al torrente sanguíneo originando una viremia primaria que causa la infección de tejidos periféricos. Entre cuatro y siete días después de la inoculación el virus podría localizarse en el SNC (Xiao *et al.*, 2001) (Figura 7), donde causa la destrucción de las neuronas del tallo encefálico, hipotálamo y médula espinal por apoptosis (Samuel, Morrey y Diamond, 2007; Shrestha, Gottlieb y Diamond, 2003). Aunque el mecanismo por el que los virus neurotrópicos atraviesan la barrera sanguínea cerebral es aún motivo de controversia (Daffis *et al.*, 2008; Diamond y Klein, 2004; Wang *et al.*, 2004), sí se ha demostrado que una mayor carga viral en la sangre acelera la entrada del virus en el SNC (Samuel y Diamond, 2006).

### **2.7.2 VNO y sistema inmune: virus *versus* organismo**

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la respuesta del sistema inmune frente a la infección por el VNO gracias a los trabajos realizados con ratones transgénicos (revisado en Samuel y Diamond, 2006), los cuales han puesto de manifiesto la necesidad de disponer de un sistema inmune íntegro para afrontarla con garantías (Diamond *et al.*, 2003b).



**Figura 7.** Cinética de aparición de la viremia y la respuesta inmune humoral tras la infección por el VNO en humanos. Adaptada de Sánchez-Seco y Navarro (2005).

Inicialmente, la respuesta innata ralentizaría la expansión viral concediendo tiempo para que la más específica y lenta respuesta adaptativa se desarrollase. La respuesta innata frente al VNO está mediada por interferones de tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ) (Samuel y Diamond, 2005), II (IFN- $\gamma$ ) (Shrestha *et al.*, 2006) y III (IFN- $\lambda$ ) (Ma *et al.*, 2009), el sistema del complemento (Mehlhop y Diamond, 2006) y células inmunitarias (linfocitos  $T\gamma\delta$ , macrófagos y células dendríticas), que ejercen una acción antiviral directa y/o indirecta modulando la respuesta adaptativa (Samuel y Diamond, 2006; Wang y Fikrig, 2004).

La respuesta adaptativa comprende la respuesta humoral (linfocitos B) y la celular (linfocitos  $T_{CD8+}$ ) engranadas ambas por los linfocitos  $T_{CD4+}$ . Apenas unos días después de la infección, linfocitos B activados producen inmunoglobulinas M (IgM) anti-VNO específicas, cruciales para limitar la viremia e impedir la diseminación del virus al SNC (Figura 7) (Diamond *et al.*, 2003c; Tardei *et al.*, 2000). Unas semanas después el patrón de anticuerpos cambia a la producción de inmunoglobulinas G (IgG) específicas, más pequeñas, que contribuyen también a limitar la diseminación y a “perseguir” los virus en aquellas regiones donde las IgM no pueden actuar debido a su tamaño (Figura 7) (Diamond *et al.*, 2003a). Los

determinantes antigénicos virales que inducen los anticuerpos más neutralizantes se localizan en el DIII de la proteína E (ver apartado 2.4.2.1), pero no son los inmunodominantes (Throsby *et al.*, 2007). Estos se localizan en los dominios I y II de la proteína E. A diferencia de lo que ocurre con otros flavivirus, el aumento de la infección mediada por anticuerpos (ADE) no se ha descrito para el VNO *in vivo*, aunque hay evidencias aportadas por experimentos *in vitro* (Engle y Diamond, 2003).

La respuesta humoral por sí sola no elimina completamente la carga viral, por lo que se requiere una respuesta celular intacta para una protección completa frente a la infección (Shrestha y Diamond, 2004). Por otro lado, estudios realizados con ratones *knock-out* para varios componentes de la respuesta celular indican que ésta podría ser responsable de procesos inmunopatológicos a nivel del SNC (Licon Luna *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Los determinantes antigénicos que promueven un tipo de respuesta inmune celular se localizan mayoritariamente en las proteínas virales no estructurales (Lanteri *et al.*, 2008; Roehrig, 2003).

### **2.7.3 Epidemiología: virus versus poblaciones**

El patrón epidemiológico del VNO cambió a finales del siglo pasado al ser el agente etiológico responsable de brotes estacionales de encefalitis en Túnez, Rumanía, Rusia, Israel y Norteamérica (ver apartado 2.2). Hasta entonces había protagonizado brotes esporádicos con raros episodios de encefalitis (Murgue, Zeller y Deubel, 2002). La emergencia de cepas más virulentas (Is-98 y NY-99) y el impacto causado sobre una población humana y animal prácticamente “naif” en EE.UU., el país más afectado, convirtieron este arbovirus en una preocupación de primer orden para los sistemas de salud pública norteamericanos (Blitvich, 2008). Muy recientemente, el virus ha vuelto a emerger en Europa; así, en 2008 se detectó un mayor número de casos en humanos y caballos, incluyendo un gran brote en caballos en Italia con 794 casos en 251 establos distintos, dando lugar a cinco muertes (Calistri *et al.*, 2010). A lo largo de este año 2010 se están registrando nuevos brotes preocupantes con casos humanos en Grecia y países limítrofes que han originado ya más de 25 muertes ([www.ecdc.europa.eu/](http://www.ecdc.europa.eu/)).

#### **2.7.3.1 Humanos**

Según estudios de seroprevalencia elaborados a partir del brote de Nueva York se calcula que aproximadamente el 80% de las infecciones por el VNO son asintomáticas y que la mayoría del 20% restante de infectados desarrolla entre 2-14 días después una sintomatología similar a una gripe denominada fiebre del Nilo (Hayes *et al.*, 2005). Los síntomas duran unos pocos días y generalmente no se requiere hospitalización (Watson *et al.*, 2004). Debido al

neotropismo del virus, en aproximadamente 1 de cada 150 individuos infectados se desarrolla una enfermedad mucho más grave que se caracteriza por ocasionar cuadros clínicos de encefalitis y/o meningitis (Hayes *et al.*, 2005). Las manifestaciones clínicas de la infección del SNC son variadas e incluyen desde desorientación y temblores a parálisis aguda y coma (Sejvar *et al.*, 2003; Tsai, 1998). Según datos epidemiológicos de EE.UU. (desde 1999 hasta 2009) la tasa de mortandad por el VNO (nº de muertes por casos diagnosticados) fue de aproximadamente el 3.9%, cifra que llegaría prácticamente al 10% si para su cálculo sólo se tuvieran en cuenta los casos neuroinvasivos ([www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile)); además, más del 50% de estos pacientes sufre secuelas neurológicas permanentes (Klee *et al.*, 2004).

Las personas ancianas e inmunodeprimidas son más vulnerables a sufrir la versión más grave de la enfermedad ya que su debilitado sistema inmune no puede impedir la infección del SNC (Brien *et al.*, 2009; McElhaney y Effros, 2009; Tsai, 1998). Otros factores de riesgo descritos, además de la edad y la integridad del sistema inmune, son las variaciones en el gen *OAS1* (análogo del *OAS1b* murino) y en el gen del receptor de la quimioquina 5 (*CCR5*), involucrados respectivamente en la respuesta antiviral mediada por interferón y en el tráfico de leucocitos al cerebro (Diamond, 2009b ; Lim *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2010).

### **2.7.3.2 Equinos**

A pesar de que al igual que en humanos la infección por el VNO es en la mayoría de los casos asintomática, la proporción de equinos que llega a desarrollar encefalitis es mayor (~10%; Castillo-Olivares y Wood, 2004). Los signos clínicos de la enfermedad incluyen, entre otros, ataxia y parálisis de los cuartos traseros (Ostlund *et al.*, 2001), que se correlacionan con afecciones patológicas en la médula espinal (Cantile *et al.*, 2000). Tras una enfermedad de unas tres semanas, la mortalidad es de aproximadamente el 40% y no está necesariamente relacionada con una mayor edad de los individuos (Castillo-Olivares y Wood, 2004; Salazar *et al.*, 2004).

La disponibilidad de vacunas veterinarias en EE.UU. ha reducido notablemente el número de casos de enfermedad causada por el VNO en equinos (Dauphin y Zientara, 2007).

### **2.7.3.3 Aves**

La susceptibilidad a la infección varía ampliamente de unas familias a otras, siendo los córvidos los más afectados (Komar *et al.*, 2003). Los signos clínicos de enfermedad en aves son: aletargamiento, ataxia y parálisis, característicos de lesiones multiorgánicas (riñón, cerebro, hígado, corazón y bazo), que devienen en meningoencefalitis y miocarditis (Blitvich,

2008). La tasa de mortandad puede ser muy elevada, incluso cercana al 90% en cuervos americanos (Yaremich *et al.*, 2004), con una duración de la enfermedad de apenas 24 horas. Debido a la elevada mortandad aviar en los brotes ocurridos en Israel, 1997-2000 (Malkinson y Banet, 2002) y EE.UU., 1999-2005 (LaDeau, Kilpatrick y Marra, 2007; Rahbek, 2007), los sondeos de seroprevalencia y el análisis virológico de las carcasas aviares representan un sistema de alerta epidemiológica temprana (Ludwig, Bigras-Poulin y Michel, 2009).

## 2.8 Diagnóstico

El diagnóstico específico es fundamental para confirmar los casos clínicos de infección por el VNO y para la realización de estudios de vigilancia epidemiológica. El diagnóstico puede ser directo o indirecto, según el tipo de muestra de partida, la fase de la infección en que fue recolectada, la forma de recolección, el estado de conservación de la muestra, etc. Los procedimientos son prácticamente idénticos independientemente de que las muestras sean humanas o animales.

### 2.8.1 Detección directa

Consiste en la detección del virus o partes del mismo. Las metodologías incluyen el cultivo viral en células susceptibles, técnicas de diagnóstico molecular y ensayos serológicos (Beaty, Calisher y Shope, 1989).

El cultivo viral se realiza principalmente a partir de tejidos homogenizados recolectados post-mortem o de grupos (*pools*) de mosquitos (Kauffman *et al.*, 2003). La recuperación de virus infecciosos resulta más complicada a partir de líquido cefalorraquídeo (LCR) y/o suero, debido a la corta duración y los bajos niveles de viremia, especialmente en muestras equinas o humanas. En estos casos, un resultado positivo es indicativo de una infección muy reciente, ya que la viremia empieza pocos días después de ésta y es de corta duración (Figura 7). Las desventajas de este método son la lentitud, los requerimientos de instalaciones de contención (NSB-3, por ser un agente zoonótico sin vacuna) y la exigencia de disponer de muestras de buena calidad (Dauphin y Zientara, 2007). A veces, cuando el efecto citopático (ECP) no es evidente, se puede recurrir a la inmunofluorescencia (IF) para detectar las partículas virales (ver más abajo en este mismo apartado).

El diagnóstico molecular consiste en la extracción y posterior amplificación del genoma viral mediante transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando parejas de cebadores específicos. Es rápido, preciso y muy sensible (Shi *et al.*, 2001) y puede aplicarse a una gran variedad de muestras, desde homogenizados de mosquitos a hisopos

aviares (Komar *et al.*, 2002). Además de la RT-PCR convencional, buscando una mayor sensibilidad, se han descrito reacciones de RT-PCR anillada (Johnson *et al.*, 2001) y RT-PCR a tiempo real (Lanciotti *et al.*, 2000). Esta última técnica aporta además la capacidad de cuantificar la cantidad de ARN viral en cada muestra, mostrando los resultados en tiempo real, por lo que ahorra la visualización de los mismos mediante electroforesis en geles de agarosa, pero tiene el inconveniente de ser una metodología costosa. La RT-PCR a tiempo real asociada a sistemas robotizados de extracción del ARN es una herramienta muy eficaz que permite el diagnóstico a gran escala (Shi *et al.*, 2001), como el que se realiza en los bancos de sangre. Actualmente se dispone de dos test comerciales para tal efecto (Kleinman *et al.*, 2005). La técnica de RT-PCR a tiempo real también se emplea en las campañas de control epidemiológico en mosquitos y aves (Kauffman *et al.*, 2003). Al igual que sucedía con el cultivo celular, la detección de ARN viral en suero o LCR es un indicador de infección reciente, especialmente en muestras equinas o humanas.

Los ensayos serológicos de detección directa están basados en el reconocimiento de antígenos virales por anticuerpos monoclonales específicos que, o bien están marcados con fluorocromos o enzimas que catalizan reacciones colorimétricas (inmunoensayo directo), o bien son reconocidos a su vez por anti-anticuerpos marcados (inmunoensayo indirecto). Estas técnicas ofrecen resultados de forma rápida y son casi igual de sensibles que el diagnóstico molecular (Foral *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2002; Macdonald *et al.*, 2005). Recientemente se han desarrollado dos test comerciales para análisis preliminares de carcasas aviares y *pools* de mosquitos, sin necesidad de laboratorios equipados ni personal entrenado, que ofrecen resultados de forma rápida y específica, pero con una sensibilidad inferior a los métodos descritos anteriormente (Burkhalter *et al.*, 2006; Sutherland y Nasci, 2007).

### **2.8.2 Detección indirecta**

La detección indirecta de la presencia del VNO plantea dos obstáculos principales a sortear: la reactividad cruzada entre flavivirus, que obliga a confirmar el diagnóstico con pruebas adicionales, y la disponibilidad de instalaciones de bioseguridad (NSB-3) para realizar algunas de estas pruebas.

El diagnóstico serológico se basa en la medición de los niveles de inmunoglobulinas específicas generadas por el sistema inmune del huésped (se encuentran en el suero y el LCR) en respuesta a la infección viral. Como se ha comentado anteriormente, la detección de virus infecciosos o ARN viral en muestras de LCR y/o suero depende del momento exacto de su recolección. Teniendo en cuenta que la viremia precede a la aparición de los síntomas (Figura

7), generalmente el diagnóstico directo a partir de este tipo de muestras no es muy eficaz. Por lo tanto, y a pesar de la dificultad de elaborar un diagnóstico específico debido a la reactividad cruzada de los flavivirus, la detección indirecta mediante técnicas serológicas se ha impuesto en el diagnóstico rutinario del VNO (Roehrig, 2003).

La técnica de referencia en el diagnóstico serológico del VNO es el ensayo de neutralización de las placas de lisis (PRNT, *Plaque Reduction Neutralization Test*) ya que es la que permite realizar un mejor diagnóstico serológico diferencial (Beaty, Calisher y Shope, 1989; Dauphin y Zientara, 2007). La reactividad cruzada, especialmente entre virus del mismo serocomplejo (ver Tabla I), es debida a la similitud de sus antígenos estructurales. Si los sueros a testar proceden de zonas endémicas en flavivirus el ensayo debe hacerse frente a varios de los virus circulantes. Así, un suero positivo específico será aquel capaz de neutralizar uno de los flavivirus circulantes con títulos, como mínimo, 4 veces superiores a los obtenidos frente al resto de virus ensayados. El inconveniente es que la técnica PRNT es costosa, consume mucho tiempo e implica trabajar con virus infectivo, por lo que generalmente se utiliza para confirmar los resultados obtenidos mediante otras pruebas serológicas. Recientemente, se ha propuesto el uso de un test de micro-neutralización colorimétrico para el diagnóstico y la diferenciación del VNO del VESL de forma más rápida y cómoda que el tradicional ensayo de neutralización en placas de 6 pocillos (Taketa-Graham *et al.*, 2010). Otros trabajos plantean pruebas confirmatorias alternativas, que sean más rápidas y menos exigentes a nivel material y humano, como el *Western blot* (Oceguera *et al.*, 2007) y el ELISA (Choi *et al.*, 2007).

Los primeros ensayos utilizados para el diagnóstico serológico fueron los de fijación del complemento (CF) e inhibición de la hemaglutinación (HI). Aunque el segundo todavía se usa en algunos laboratorios, ambos han sido paulatinamente sustituidos por inmunoensayos enzimáticos (ELISA) o de fluorescencia (IFA), más sensibles y rápidos. Además, los inmunoensayos detectan los distintos tipos de inmunoglobulinas específicas, por lo que permiten diferenciar infecciones tempranas (IgM) de tardías (IgG) (Figura 7). Con una sensibilidad y especificidad similares (Malan *et al.*, 2003), el ELISA ofrece mejores prestaciones (menor coste y análisis de múltiples muestras de forma rápida), por lo que es la metodología más utilizada en el diagnóstico y los sondeos serológicos del VNO (Dauphin y Zientara, 2007).

Partiendo de modelos establecidos frente a otros flavivirus (Johnson *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000) se han puesto a punto varios tipos de ELISA para la detección de inmunoglobulinas anti-VNO en muestras aviarias, equinas o humanas. Estos ensayos se pueden clasificar en: ensayos de competición, de captura de IgM y de detección de IgG.

Los ensayos de competición se desarrollaron para diagnosticar la infección en múltiples especies aviarias sin necesidad de disponer de anti-anticuerpos específicos de especie (Blitvich *et al.*, 2003b). Posteriormente también se ha utilizado esta aproximación para elaborar un diagnóstico específico en humanos, utilizando virus entero inactivado como antígeno (Lorono-Pino *et al.*, 2009), y caballos, utilizando como antígeno la proteína NS1 recombinante (Kitai *et al.*, 2007). También existe un ELISA comercial de competición para diagnóstico veterinario (en aves y equinos) del VNO (ID Vet, Francia; [www.id-vet.com](http://www.id-vet.com)). Sin embargo, a diferencia de los ensayos de captura de IgM y de detección de IgG, los ELISAs de competición no distinguen entre tipos de inmunoglobulinas.

El ensayo de captura de IgM, o MAC-ELISA, por su rapidez y especificidad, y dada la corta duración de la viremia en humanos y equinos, es el método más utilizado para diagnosticar infecciones tempranas (Figura 7) (Holmes *et al.*, 2005). A pesar de que otros trabajos sugieren cautela a la hora de considerar la presencia de IgM como un indicador de infección temprana ya que ha sido demostrada su persistencia en pacientes (Kapoor *et al.*, 2004; Roehrig *et al.*, 2003), el MAC-ELISA es el método más utilizado en el diagnóstico clínico.

La detección de IgG permite el diagnóstico de la fase tardía de la infección y facilita la elaboración de estudios epidemiológicos ya que las IgG persisten durante varios años (Busch *et al.*, 2008). La combinación de los ensayos enzimáticos de detección de IgG e IgM permite conocer el perfil de la respuesta humoral del paciente y elaborar un diagnóstico sensitivo y específico, especialmente si se dispone de muestras seriadas (Tardei *et al.*, 2000).

Actualmente existen estuches comerciales para diagnóstico humano de la infección por el VNO basados en ensayos de captura de IgM y de detección indirecta de IgG (Focus Diagnostics Inc., EE.UU.; PanBio Diagnostics, Australia; Euroimmun AG, Alemania; InBios International Inc., EE.UU.). PanBio y Euroimmun disponen además de un ELISA que diferencia entre infecciones “primarias” y “secundarias” (Fox *et al.*, 2006; Levett *et al.*, 2005) y también comercializan ensayos de detección mediante inmunofluorescencia (IFA).

En la mayoría de laboratorios de referencia, el antígeno utilizado para el diagnóstico del VNO mediante ELISA consiste en virus inactivado, obtenido a partir de cultivos celulares infectados o de cerebros de ratones lactantes inoculados con el virus. Este tipo de antígenos es también el utilizado en la mayoría de ELISAs comerciales, con los riesgos de escape y de manipulación inherentes a su cultivo en grandes cantidades. El desarrollo de antígenos recombinantes no infecciosos expresados en células de mamífero (Davis *et al.*, 2001; Muerhoff *et al.*, 2004), de insecto (Bonafé *et al.*, 2009; Muerhoff *et al.*, 2004) o bacterias (Wang *et al.*,



2002) dota a laboratorios que no pueden manipular el VNO por restricciones de seguridad con herramientas útiles para poder elaborar un diagnóstico serológico eficaz. También se han empleado antígenos recombinantes en el desarrollo de ELISAs específicos para evitar recurrir a la PRNT como prueba confirmatoria (Beasley *et al.*, 2004b; Holbrook, Shope y Barret, 2004; Roberson, Crill y Chang, 2007).

A pesar de la rapidez del ELISA con respecto a la técnica de PRNT, se están investigando metodologías diagnósticas alternativas que permitan detectar anticuerpos anti-VNO de forma más rápida. Estas se basan en inmunosensores asociados a reacciones colorimétricas (Herrmann *et al.*, 2005; Ionescu *et al.*, 2007), así como en el uso de microesferas como soportes de reacciones de fluorescencia donde la especificidad la aportaría la proteína E viral (Wong *et al.*, 2004) o las proteínas no estructurales NS1, NS3 y/o NS5 (ver apartado 2.4.2.2) (Balasuriya *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2003).

## 2.9 Desarrollo de vacunas y antivirales

Desde que el VNO se expandió por EE.UU., donde ha ocasionado ya más de 1.100 muertes, se han invertido numerosos esfuerzos en el desarrollo de vacunas. Sin embargo, la baja incidencia de la enfermedad a partir del año 2004 hizo que se cuestionara el coste-efectividad de una vacunación generalizada de la población (Zohrabian, Hayes y Petersen, 2006). Si los actuales valores epidemiológicos se mantienen, los candidatos a recibir una posible vacuna frente al virus serán únicamente los grupos poblacionales más vulnerables a la infección (personas ancianas, inmunodeprimidas o con factores genéticos asociados a una mayor susceptibilidad a la infección; ver apartado 2.7.3.1), o aquellos cercanos a brotes graves, en los que se utilizaría de forma preventiva (Martina, Koraka y Osterhaus, 2010). La seguridad, la capacidad inmunogénica y los costes de desarrollo y producción de una posible vacuna deben estar por lo tanto muy bien equilibrados. Persiguiendo estos objetivos, los investigadores han cubierto un amplio abanico de estrategias: virus inactivado (Lim *et al.*, 2008; Tesh *et al.*, 2002) o atenuado (Lustig *et al.*, 2000; Yamshchikov *et al.*, 2004); virus quiméricos recombinantes (Coutant *et al.*, 2008; Despres *et al.*, 2005; Minke *et al.*, 2004; Monath *et al.*, 2006; Pletnev *et al.*, 2003); vacunas basadas en ADN (Davis *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2003), para las que nuevos aspectos funcionales han sido propuestos (Chang *et al.*, 2008; Widman *et al.*, 2008); subunidades proteicas inmunogénicas producidas en sistemas heterólogos (Bonafé *et al.*, 2009; Ledizet *et al.*, 2005; Lieberman *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2001b) e incluso péptidos virales (Gershoni-Yahalom *et al.*, 2010). Algunas de estas estrategias están en fase de ensayo clínico, como las basadas en ADN (Martin *et al.*, 2007), las quimeras

recombinantes de VFA-VNO (Hall y Khromykh, 2007) y DEN4-VNO (Pletnev *et al.*, 2006) y las subunidades proteicas expresadas en células de insecto S2 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

En la actualidad, dadas las condiciones de desarrollo menos restrictivas, ya hay varias vacunas disponibles en el mercado estadounidense para uso en equinos que han servido para reducir notablemente el número de animales afectados por la infección (Dauphin y Zientara, 2007). La primera y la última en salir a la venta se basan en virus inactivado (WN-Innovator<sup>®</sup> de Fort Dodge Animal Health y Vetera<sup>™</sup> de Boehringer-Ingelheim). Fort Dodge Animal Health comercializa también la primera vacuna de ADN (WN-Innovator-DNA<sup>®</sup>) que ha sido aprobada. Finalmente, existen otras dos vacunas recombinantes que utilizan respectivamente como vector de las proteínas estructurales del VNO un canarypoxvirus (Minke *et al.*, 2004) (Recombitek<sup>®</sup> de Merial) y la tecnología ChimeriVax (Arroyo *et al.*, 2001) (Prevenile<sup>™</sup> de Intervet). Por otra parte, en Israel se han usado tanto virus inactivado (Samina *et al.*, 2005) como variantes atenuadas (Lustig *et al.*, 2000) para inmunizar gansos.

Actualmente no hay disponible ninguna terapia anti-VNO específica y en caso de enfermedad sólo se tratan los síntomas. No obstante, como alternativa al desarrollo de vacunas ya hay varios antivirales que están siendo evaluados en ensayos clínicos ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Por ejemplo, un derivado de IFN- $\alpha$  que demostró su eficacia antiviral frente al VNO *in vitro* (Anderson y Rahal, 2002) y en pacientes ingresados por infección con el VESL (Rahal *et al.*, 2004). Las terapias basadas en anticuerpos neutralizantes han demostrado su eficacia en ratones (Engle y Diamond, 2003) y en la recuperación de pacientes aquejados de encefalitis causada por el VNO en Israel (Shimoni *et al.*, 2001). Los pacientes fueron tratados con un preparado de inmunoglobulinas humanas con un título elevado de inmunoglobulinas anti-VNO específicas, cuya concentración y pureza se ha mejorado en trabajos posteriores (Ben-Nathan *et al.*, 2009; Haley *et al.*, 2003). En cualquier caso, al ser este producto un derivado sanguíneo, el riesgo de transmisión de otras enfermedades es latente. Otros trabajos han focalizado sus esfuerzos en el desarrollo y la caracterización de anticuerpos monoclonales de origen murino, muy neutralizantes, humanizados (Diamond, 2009a; Oliphant *et al.*, 2005), cuya síntesis se ha establecido en plantas en vistas a una producción comercial (Lai *et al.*, 2010).





## **Objetivos**



### **3. Objetivos**

Los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido:

1. Estudiar la prevalencia de anticuerpos específicos frente al VNO en muestras séricas equinas procedentes de México.
2. Obtener y caracterizar antígenos recombinantes del VNO empleando el sistema de expresión heteróloga de baculovirus recombinantes y larvas de insecto como bio-factorías.
3. Desarrollar y validar un sistema diagnóstico de detección indirecta de la infección con el VNO en muestras animales basado en el uso del antígeno no infeccioso recombinante generado.
4. Testar la capacidad inmunogénica y protectora de los antígenos generados frente al VNO en el sistema murino de experimentación animal.
5. Estudiar las rutas de transmisión vertical de la inmunidad adquirida por ratonas gestantes tras la inmunización con las proteínas recombinantes generadas.





## **Materiales y métodos**



## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Virus

El virus del Nilo Occidental (VNO) utilizado en esta Tesis proviene de una cepa aislada durante el brote de Nueva York de 1999 (Lanciotti *et al.*, 1999) que fue amablemente cedido por el Dr. H. von Briesen (Georg-Speyer Haus, Frankfurt del Main, Alemania). El stock de uso del laboratorio se obtuvo tras cinco pases sucesivos en células BHK-21 hasta alcanzar un título de  $5 \times 10^8$  UFP/ml. Todas las manipulaciones que implicaron la utilización de virus infectivo se realizaron en las instalaciones de bioseguridad de nivel 3 (NSB-3) del INIA.

### 4.2 Cultivo de células eucariotas

Se han utilizado tres líneas celulares:

- Vero y BHK-21: células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) y fibroblastos de riñón de hámster sirio dorado (*Mesocricetus aureatus*), respectivamente, conservadas en nitrógeno líquido como parte de la colección del laboratorio. Los viales de células congeladas de 1 ml (90% de SFB y 10% DMSO) se descongelaron a 37° C. Tras una centrifugación a 250 x g durante 5 min para eliminar el exceso de SFB y el DMSO, el pellet de células resultante fue resuspendido en medio de cultivo Eagle (EMEM, Lonza) al 10% de SFB, suplementado con 100 U/ml de penicilina (Lonza), 100 µg/ml de estreptomicina (Lonza) y 2mM de L-glutamina (Lonza). Las células se distribuyeron en frascos de cultivo celular (Nunc o Falcon) en ese mismo medio hasta alcanzar la confluencia. El mantenimiento de los cultivos se realizó en medio EMEM completo al 5% de SFB, en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>, 98% de humedad y 37° C de temperatura. Las monocapas de células fueron despegadas con tripsina (Gibco, Invitrogen) y sembradas en nuevos frascos o placas a la dilución requerida (subcultivo o pase).
- Sf21: células de tejido ovárico de la pupa del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977), amablemente cedidas por el Dr. J. M. Escribano (INIA). Se crecieron en frascos de cultivo (Falcon) con medio TNM-FH (BD-Biosciences) suplementado con 0.5 mg/ml de gentamicina (Sigma) a 27° C de temperatura. Las células se despegaron con medio fresco utilizando raspadores (Iwaki). En caso de necesitar una siembra precisa, las células se contaron previamente en cámaras de Neubauer.

### **4.3 Infecciones virales**

#### **4.3.1 Amplificación de VNO: infección en medio líquido**

Las infecciones se realizaron sobre células Vero sembradas cercanas a la confluencia con virus diluido en medio EMEM completo sin SFB (200 µl/pocillo) a una multiplicidad de infección (m.d.i.) aproximada de 0.1. Antes de añadir el virus las células se lavaron con medio EMEM sin SFB. Se dejaron adsorber los inóculos por una hora a 37° C, en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad, con agitación suave cada 15 min para evitar que se secan las células. Transcurrido el periodo de adsorción, se retiró el virus y se añadió medio de cultivo completo al 2.5% de SFB.

#### **4.3.2 Titulación de VNO: infección en medio semisólido**

Se realizó a partir de sobrenadantes de cultivos infectados. Diluciones decimales de los mismos en medio EMEM completo sin SFB se añadieron sobre células Vero subconfluentes sembradas en placas de 6 pocillos de 35 mm de diámetro. Las infecciones se realizaron igual que en 4.3.1. Tras la adsorción se retiraron los inóculos y se añadió medio semisólido compuesto por EMEM 2x suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y L-glutamina (2 mM), agarosa de bajo punto de fusión al 2% y SFB al 1.8%. Tras permanecer durante 72 horas a 37° C, en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad, las células se fijaron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) al 10% de formaldehído. Se retiró la agarosa y se tiñeron las células con cristal violeta al 0.3%. El exceso de cristal violeta fue retirado con agua y una vez secas al aire se contaron las placas de lisis. El título viral se expresó como unidades formadoras de placa por ml de sobrenadante (UFP/ml).

#### **4.3.3 Obtención de virus inactivado (antígeno viral)**

Se infectaron células Vero sembradas en frascos de 150 cm<sup>2</sup> a aproximadamente una m.d.i. = 0.1. Entre 40 y 72 horas después se recolectaron y se procesaron como se describe en Blitvich *et al.* (2003b) salvo que se usó el tampón de tapizado (0.015 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.030 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) para resuspender y lavar las células. El antígeno viral se inactivó por temperatura durante 1 h a 60° C. La eficacia de la inactivación se comprobó mediante infección en medio líquido de monocapas de células Vero en tres pases ciegos sucesivos, verificando la total ausencia de efecto citopático. El antígeno negativo (Ir-Vero) se obtuvo procesando de igual manera células Vero sin infectar.

## 4.4 Manipulación de ácidos nucleicos

### 4.4.1 Extracción de ARN vírico

El ARN del VNO se extrajo de dos tipos de muestras:

a) A partir de 140 µl de sobrenadante de cultivo de células Vero infectadas (ver apartado 4.3.1) utilizando el estuche comercial QIAmp viral RNA minikit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

b) A partir de 100 µl de tejido cerebral homogenizado (ver apartado 4.12.3) utilizando un protocolo modificado de BioSprint 15 DNA Blood kit (Qiagen) y el robot BioSprint 15 (Qiagen).

En ambos casos el ARN se resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato (H<sub>2</sub>O-DEPC) y se almacenó a -80° C hasta su utilización.

### 4.4.2 Síntesis y amplificación de ADNc

La transcripción inversa a partir del ARN viral extraído de sobrenadantes de cultivos infectados (ver arriba, apartado 4.4.1a) y la posterior amplificación del ADNc específico se llevó a cabo en un solo paso (RT-PCR) utilizando la enzima SuperScript One-Step RT-PCR Platinum *Taq DNA polymerase* (Invitrogen) con los cebadores *EcoRI*-WNV-E y *BamHI*-WNV-E, siguiendo las recomendaciones de la casa proveedora. Para amplificar el fragmento génico que codifica la parte soluble de la proteína E (Es, nt 967-nt 2322 en la secuencia del GenBank AF196835) se empleó el ADNc previamente amplificado como molde de una PCR en dos tiempos, con la polimerasa Expanded High Fidelity (Roche) y los cebadores específicos *BamHI*-WNV-Es y *KpnI*-WNV-Es. El fragmento génico específico que codifica la región del dominio III de la proteína E fue amplificado a partir del plásmido pFastMel-Es-His (ver apartado 4.5.1). En este caso se utilizó la polimerasa *Pfx-Safe* (Invitrogen) y los cebadores *BamHI*-WNV-DIII y *KpnI*-WNV-DIII. Para la PCR de rastreo de colonias positivas en el proceso de clonaje se utilizó la polimerasa *Taq-red* de Bioron, que lleva un colorante incorporado. La posición y secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos cebadores utilizados se indica en la Tabla II.

El tamaño y pureza de los fragmentos de ADN amplificados se determinó por electroforesis en geles de agarosa (Promega): al 1% para fragmentos mayores a 1 Kb y al 2% para fragmentos entre 0.1 y 1 Kb. Para resolver la síntesis de fragmentos menores a 0.1 Kb se utilizaron geles de agarosa de alta resolución (MS8, Pronadisa) al 3%.

**Tabla II. Oligonucleótidos cebadores utilizados.**

Región <sup>a</sup>	Cebador	Secuencia (5' a 3') <sup>b</sup>	Orientación <sup>c</sup>	Posición <sup>d</sup>
E	FEWU	CCTTGGAATGAGCAACAGAGACTT	s	975
E	REWU	ATTTGGCAAAGGAAGCATTGACAC	a	1287
M	<i>EcoRI</i> -WNV-E	GATGGAATTCAGGAAGCAACACAATGC	s	890
E-NS1	<i>BamHI</i> -WNV-E	GCACGCTGACACTGGGTGTTAAATGGATCCCAGCCGGCA	a	2463
E	<i>BamHI</i> -WNV-Es	CCAGCGGATCCCTTCAACTGTTTAGGAATG	s	955
E	<i>KpnI</i> -WNV-Es	TTCGGAGGAGCATTCCGCTCAGGTACCGGAGGC	a	2302
E	WSQF-1	CGTGCTGACCCAGCTTTTGT	s	1219
E	WSQF-2	CCACGGTCAGGGATTGACAC	s	1540
E	WSQF-3	AGTGGTGGGCAGAGGAGAAC	s	2118
E	<i>KpnI</i> -WNV-E-mut-f	CGGAGGAGCATTCCGCTCAGGTACCC	s	2304
E	<i>KpnI</i> -WNV-E-mut-r	CGGAGGAGCATTCCGCTCAGGTACCC	a	2304
E-DIII	<i>BamHI</i> -WNV-DIII	GGAAAAGGATCCGTTGAAGGGAACA	s	1842
E-DIII	<i>KpnI</i> -WNV-DIII	ACAAGTCTGGAAGCGGTACCGGCAA	a	2159
pMelBac	pFastBac-Rev	AATCAGCCATAACCATTTG	a	4142
3' UTR	WNV-1F <sup>e</sup>	CAGACCACGCTACGGCG	s	10668
3' UTR	WNV-2R <sup>e</sup>	CCCACGCGGCCCTAG	a	10756
3' UTR	Sonda WNV-FAM <sup>e</sup>	TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGAT	s	10691

<sup>a</sup> Región genómica del VNO a la que corresponde el oligonucleótido. <sup>b</sup> Los sitios de restricción aparecen subrayados. <sup>c</sup> Orientación del oligonucleótido iniciador: s significa sentido (igual polaridad que el genoma viral); a significa antisentido (oligonucleótido iniciador que hibrida en la hebra complementaria). <sup>d</sup> Posición en el genoma viral de la cepa de VNO 382-99, GenBank AF196835; excepto pFastBac-Rev que hibrida con el vector pFastMel. <sup>e</sup> Los cebadores y la sonda utilizados en la RT-PCR a tiempo real son los descritos en (Lanciotti *et al.*, 2000).

#### 4.4.3 RT-PCR a tiempo real

Para detectar la presencia de ARN viral en los cerebros de ratón recolectados (ver apartado 4.12.3) se utilizó el estuche TaqMan One-Step RT-PCR Mastermix (Applied Biosystems) con un juego de cebadores y sonda descritos previamente (Lanciotti *et al.*, 2000) (Tabla II). La sonda utilizada se encargó a Eurogentec y estaba marcada en 5' con la molécula emisora de fluorescencia 6-carboxifluoresceína (FAM) y en 3' con el inhibidor de la misma 6-carboxi-*N,N,N',N'*-tetrametilrodamina (TAMRA). La reacción se llevó a cabo en un aparato Rotor Gene Taqman (Rotor Gene).

#### 4.4.4 Cuantificación y purificación de ADN

La cuantificación de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa y espectrofotometría UV con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop).

La purificación de ADN se realizó con los estuches comerciales de Qiagen, PCR Extraction y Gel Extraction, siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando fue necesario, el ADN se purificó de gel previa resolución en geles de agarosa de bajo punto de fusión (LM-Sieve, Pronadisa).

#### 4.4.5 Secuenciación de ADN

Los plásmidos generados durante el proceso de clonaje molecular (ver abajo, apartado 4.5) fueron secuenciados por la empresa Secugen mediante el secuenciador automático multicapilar ABI Prism 3730 (Applied Biosystems) y el estuche BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Abi Prism, Perkin Elmer).

### 4.5 Clonaje molecular

#### 4.5.1 Obtención de pFastMel-Es-His

El plásmido pFastMel-B2 utilizado en el proceso de clonaje molecular es una modificación del vector comercial pFastBac-B1 (Invitrogen) realizada por el Dr. M. Pérez-Filgueira en nuestro departamento. La modificación consistió en introducir la secuencia génica que codifica el péptido señal (PS) de la melitina (Tessier *et al.*, 1991) en el área de influencia del promotor de polihedrina utilizando los sitios de restricción disponibles en el sitio de clonaje múltiple (SCM) del vector comercial. Los segmentos génicos clonados se introjeron en pFastMel-B2 aprovechando las dianas de restricción remanentes en el SCM y considerando la pauta de lectura del PS de la melitina. El vector modificado se transformó en bacterias electrocompetentes *E.coli* (DH5 $\alpha$ -Electromax, Invitrogen) que fueron

posteriormente sembradas en placas de agar con medio LB (Luria y Burrows, 1957) suplementadas con ampicilina (150 µg/ml). Las colonias capaces de crecer se picaron y crecieron en medio líquido LB o TB (ver apartado 4.15) suplementados con ampicilina (150 µg/ml) durante toda la noche (O/N) a 37° C en agitación constante a 220 r.p.m. El ADN plasmídico (pFastMel-B2) se extrajo siguiendo un protocolo de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001).

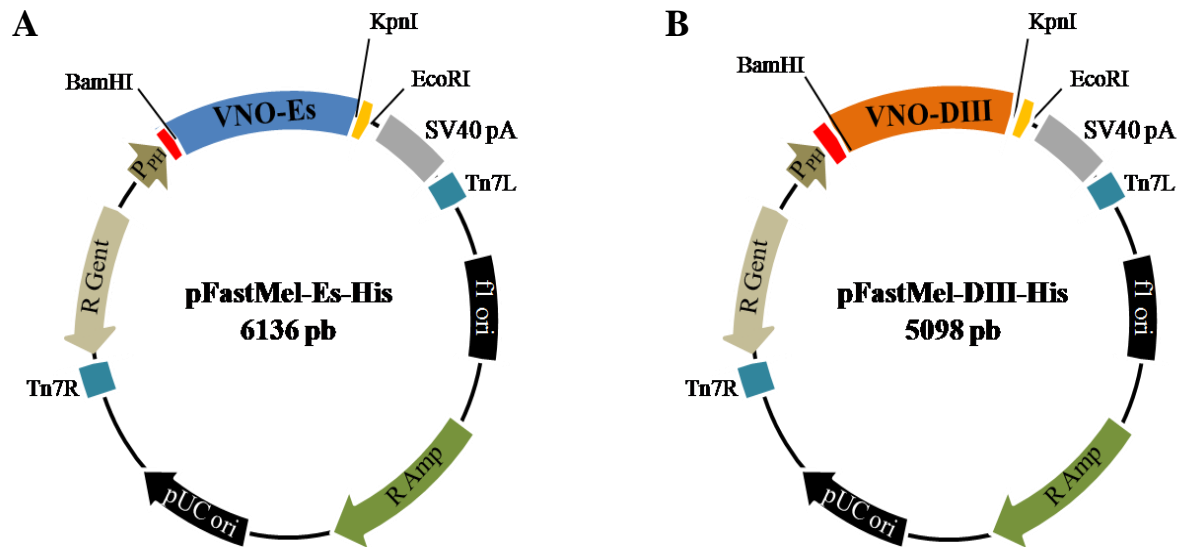
El inserto génico correspondiente a la parte soluble de la proteína E y el vector (pFastMel-B2) fueron digeridos asimétricamente de forma secuencial con *BamHI* y *KpnI*, purificados y cuantificados. Los extremos cohesivos permitieron la ligación de ambos con la ligasa T4 (Roche) para dar lugar al plásmido pFastMel-Es. Se comprobó la integridad del inserto y su correcta inserción en el vector mediante digestión diferencial con enzimas de restricción y secuenciación. Una delección introducida de forma inesperada por el cebador antisentido utilizado en la síntesis del inserto fue revertida gracias al estuche Quickchange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) y el juego de oligonucleótidos *KpnI*-WNV-E-mut-f y *KpnI*-WNV-E-mut-r (Tabla II).

Un fragmento génico que codifica la síntesis de un epítipo de seis histidinas se clonó en el extremo 3' terminal del inserto en pFastMel-Es. El fragmento fue generado por ligación inducida (92° C durante 5 min y posterior descenso lento de la temperatura) de los oligonucleótidos *KpnI*-His-*EcoRI*-f 5'-CCATCATCACCATCACCATTGAG-3' y *KpnI*-His-*EcoRI*-r 5'-AATTCTCAATGGTGATGGTGATGATGGGTAC-3'. Se digirió el vector con *KpnI* y *EcoRI*. Inserto y vector fueron purificados y ligados. El resultado fue el plásmido pFastMel-Es-His (Figura 8A), que fue secuenciado.

#### **4.5.2 Obtención de pFastMel-DIII-His**

El fragmento génico amplificado que codifica el dominio III (DIII) de E (nt 1854-nt 2172 de la secuencia GenBank AF196835) y el vector pFastMel-Es-His fueron digeridos con *BamHI* y *KpnI*, purificados y ligados por la enzima ADN ligasa T4. La integridad del plásmido resultante pFastMel-DIII-His (Figura 8B) fue comprobada mediante digestión diferencial y secuenciación. No se encontró ninguna diferencia con respecto a la cepa original.





**Figura 8.** Plásmidos derivados del vector comercial pFastBac-1<sup>TM</sup> al que se le ha añadido la secuencia del péptido señal de la melitina (en rojo). La transcripción de ésta y de los insertos génicos introducidos (A: Es; B: DIII) queda regulada por el promotor tardío de polihedrina (P<sub>PH</sub>). La secuencia que codifica el epítipo de 6 histidinas (naranja claro) se clonó posteriormente mediante digestión asimétrica con las enzimas *KpnI* y *EcoRI*.

#### 4.6 Generación de los baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes rBac-Es y rBac-DIII se obtuvieron utilizando la tecnología Bac-to-Bac (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, ésta consiste en una recombinación homóloga entre un plásmido donador (pFastMel-Es-His o pFastMel-DIII-His) que contiene la secuencia recombinante y un báculo (ADN circular que codifica el genoma completo del baculovirus *AcNPV*), que porta la cepa de *E.coli* DH10-Bac (Invitrogen). La recombinación es mediada por una transposasa codificada por un plásmido auxiliar de esa misma cepa. La recombinación inserta el fragmento recombinante en fase con el promotor tardío de la polihedrina (P<sub>PH</sub>), con la particularidad en nuestro caso, de que el péptido señal de la melitina precede al gen de interés (ver apartado 4.5.1). Los báculos recombinantes se purificaron por medio de un estuche comercial (Large-Construct kit, Qiagen) y se comprobó el éxito de la recombinación mediante PCR. Los báculos se transfectoron en células de insecto *Sf21*, susceptibles a la infección con baculovirus, por medio del reactivo Cellfectin (Invitrogen). La expresión de los báculos recombinantes en las células dio lugar a baculovirus recombinantes infecciosos en el sobrenadante de cultivo 72

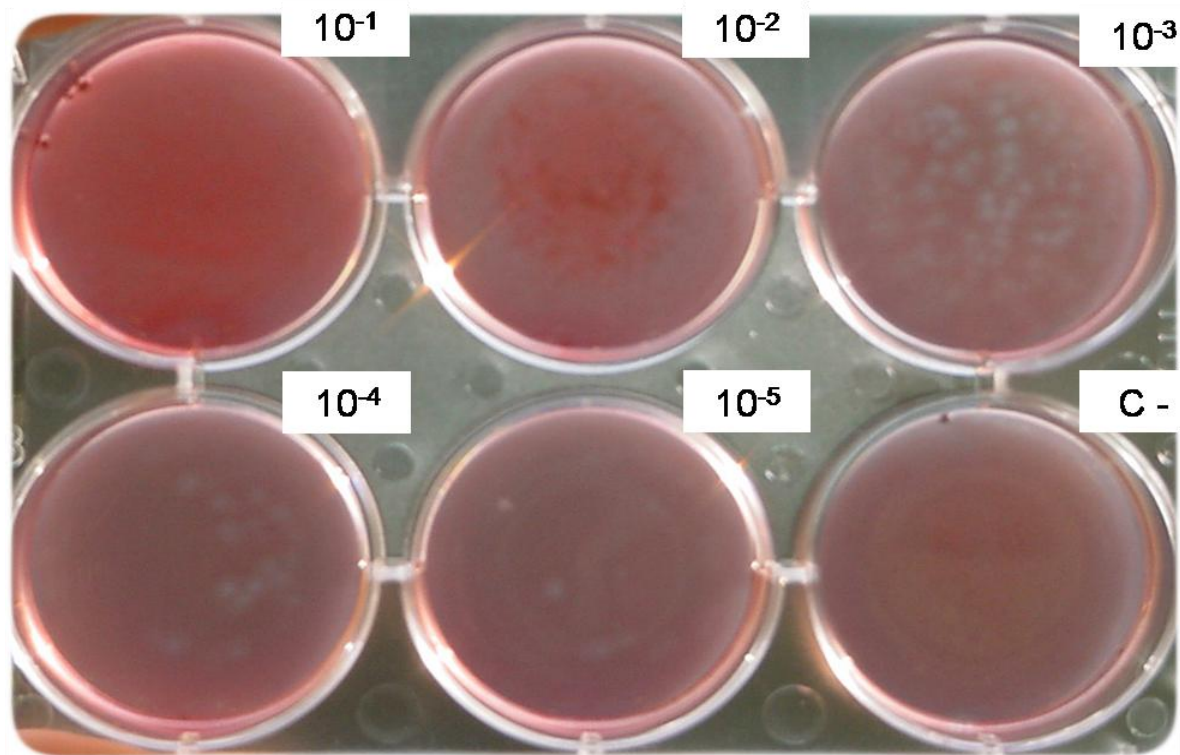
horas después de la transfección. Los sobrenadantes se clarificaron tras una centrifugación a 250 x g durante 5 min. Se obtuvo de esta manera el primer pase de los baculovirus recombinantes infecciosos.

#### **4.6.1 Amplificación de baculovirus recombinantes**

Con los sobrenadantes recolectados se infectaron células *Sf21* sembradas al 80% de confluencia. Los inóculos se dejaron adsorber una hora a 27° C. Sin retirarlos, se complementaron los cultivos con el volumen correspondiente de medio de crecimiento (TNM-FH, BD-Biosciences) según la superficie de cultivo utilizada y se observaron diariamente los signos de infección. Cuando el cultivo mostró signos evidentes de efecto citopático (generalmente a las 72 h.p.i), caracterizado por células de diámetro aumentado, aspecto granular y comenzando a desprenderse del soporte plástico, se recolectó el sobrenadante que fue clarificado tras una centrifugación a 250 x g durante 5 min a 4° C. Parte de los sobrenadantes se conservó a 4° C para su uso inmediato. Para un almacenamiento prolongado, el resto se congeló a -80° C. Se dieron hasta cinco pases sucesivos de amplificación en superficies de cultivo crecientes para generar una reserva de baculovirus recombinantes.

#### **4.6.2 Titulación de baculovirus recombinantes**

Se realizó por duplicado infectando células *Sf21* sembradas en placas de 6 pocillos de 35 mm (Nunc; aproximadamente 10<sup>6</sup> células/pocillo). Se realizaron diluciones decimales seriadas de los virus en medio TNM-FH (inóculos de 500 µl), que fueron añadidas sobre las células tras un lavado con el mismo medio. Después de una hora de adsorción se retiraron los inóculos y se añadió medio semisólido (mezcla homogénea de agarosa de bajo punto de fusión al 2% y TNM-FH); cuando solidificó, se añadieron 2 ml de medio de cultivo sobre la agarosa. Las infecciones se dejaron progresar a 27° C durante siete días protegidas de la luz. Transcurrido ese tiempo se tiñeron las células con una solución de rojo neutro al 0.03% (peso/volumen) en PBS durante 3 horas a 27° C. Se retiró la tinción y las placas se dejaron durante unas horas a 4° C protegidas de la luz para que fuera más fácil contar las calvas. Éstas se contaron sin retirar la agarosa (Figura 9).



**Figura 9.** Titulación en células *Sf21* del tercer pase de amplificación de rBac-Es.

#### 4.7 Inoculación de larvas

Larvas del lepidóptero *Trichoplusia ni* se inocularon como se ha descrito previamente (Pérez-Filgueira *et al.*, 2006) con aproximadamente  $10^5$  UFP/larva del baculovirus recombinante correspondiente (rBac-Es o rBac-DIII) o con la misma cantidad de un baculovirus salvaje irrelevante (Bac-*wt*), que fue amablemente cedido por el Dr. J. M. Escribano (INIA) y se utilizó como baculovirus control. La infección se dejó progresar por 72 horas, momento en que se congelaron las larvas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, o a  $-80^{\circ}\text{C}$  en caso de un almacenamiento prolongado (de más de 3 meses).

##### 4.7.1 Procesamiento de larvas

Consistió en realizar un homogenizado de las larvas por medios físicos, bien con una batidora de laboratorio (Lab Blender, Waring Commercial) o con un triturador BagMixer (Interscience). El homogenizado obtenido se solubilizó en dos tampones distintos, según se quisiera disponer de extracto de larvas crudo (a) o proseguir con la purificación de las proteínas recombinantes (b). En los dos casos, 10 larvas se homogenizaron en 20 ml de solución. Cada una de éstas estaba compuesta por:

- a) PBS 1x (pH 7.4), 1% de Triton x-100 (Sigma-Aldrich); 25 mM de DTT (Sigma-Aldrich), 1x de inhibidor de proteasas Complete EDTA-*free* (Roche) y H<sub>2</sub>O hasta completar volumen.
- b) Imidazol 10 mM (Merck), 1% de Triton x-100, 10 mM de tampón fosfato (pH 7.4; ver apartado 4.15), 1 mM de DTT, 1x de inhibidor de proteasas Complete y H<sub>2</sub>O hasta completar volumen.

Los homogenizados se centrifugaron a 3.000 x g durante 15 min a 4° C (rotor JA-20 de Beckman Coulter) para descartar los restos larvarios más gruesos. El sobrenadante obtenido se filtró por papel Miracloth (Calbiochem) y se ultrasonicó 3 veces a máxima amplitud con un ultrasonicador de *tip* UP200S (Hielscher) y se centrifugó de nuevo a 14.600 x g durante 15 min a 4° C. Si el homogenizado de larvas se solubilizó con la solución (a) el sobrenadante que se recogió después de esta centrifugación se denominó extracto crudo. Si se solubilizaron las larvas en la solución (b), este sobrenadante se cargaría en columnas pre-empaquetadas de resinas ricas en Ni<sup>2+</sup> (His GraviTrap, GE-Healthcare) para purificar las proteínas recombinantes en base a su epítipo de 6 histidinas, tal y como se describe a continuación.

#### **4.8 Purificación de proteínas**

Las proteínas recombinantes (rE y rDIII) fueron purificadas parcialmente mediante cromatografía de afinidad con columnas comerciales His Gravitrap (Ge-Healthcare). Las columnas se equilibraron previamente con una solución compuesta por imidazol (10 mM) y tampón fosfato (ver apartado 4.15). Se cargaron los sobrenadantes procesados en las columnas. Tras haber pasado éstos, se realizaron dos lavados con la solución de equilibrio de las columnas y con la misma solución aumentando la concentración de imidazol a 20 mM. Las proteínas recombinantes adheridas a la resina se desprendieron pasando por la columna una solución tamponada de fosfato con imidazol a 500 mM e inhibidor de proteasas 1x. Las proteínas rE y rDIII se recolectaron en diferentes fracciones. La concentración de proteínas en las mismas se cuantificó mediante reactivo de Bradford (BioRad) (Bradford, 1976). Alternativamente, la concentración proteica de las muestras se resolvió mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (apartado 4.9.1) y tinción con azul de Coomassie con respecto a cantidades conocidas de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma). Las mismas condiciones se aplicaron para procesar y cuantificar un homogenizado de larvas inoculadas con un baculovirus irrelevante (Bac-*wt*) para obtener Ir-Bac, que sería utilizado como control negativo de especificidad en las pruebas de inmunodetección posteriores.

#### 4.8.1 Dialización y liofilización de proteínas

Las fracciones eluidas que contenían mayores concentraciones de proteínas recombinantes se dializaron frente a concentraciones decrecientes de imidazol utilizando membranas Dialysis Tubing Visking 8/32 de 6 mm (MWCO 12.000-14.000 Da; Serva Electrophoresis), hasta quedar finalmente solubilizadas en tampón PBS 1x (pH = 7.4). Este tratamiento fue requisito previo a la liofilización de las subunidades purificadas debido a que el imidazol interfiere con dicho proceso.

La liofilización se llevó a cabo O/N en un liofilizador 2K VirTis con una bomba de vacío Trivac E2.

#### 4.9 Ensayos de inmunodetección

Los anticuerpos primarios empleados se muestran en la Tabla III. Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa utilizados fueron: anti-IgG de ratón (Sigma), proteína-G (Invitrogen) y anti-Ig de conejo (Dako).

**Tabla III. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en esta Tesis.**

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Tipo	Referencia/Compañía
3.67G	VNO-E	Ratón	AcM	(Blitvich <i>et al.</i> , 2003b)/Millipore
3.112	VNO-NS1	Ratón	AcM	(Blitvich <i>et al.</i> , 2003b)/Millipore
6B6C1	VESL	Ratón	AcM	(Blitvich <i>et al.</i> , 2003b)/Millipore
HMAF <sup>1</sup>	VNO	Ratón	AcP	(Despres <i>et al.</i> , 2005)
E24 <sup>2</sup>	VNO-DIII	Ratón	AcM	(Oliphant <i>et al.</i> , 2007)
Anti-VNO +15	VNO	Conejo	AcP	<sup>3</sup>
Anti-VNO +49	VNO	Conejo	AcP	<sup>3</sup>
Anti-VNO	VNO	Ratón	AcP	(Cordoba <i>et al.</i> , 2007)
Anti-IgG-PO	IgG murina	Cabra	AcP	Sigma-Aldrich
Proteína G-PO	IgG <sup>4</sup>	-	AcM	Invitrogen
Anti-conejo-PO	Ig de conejo	Rata	AcP	Dako Immunolon

<sup>a</sup> AcM: anticuerpo monoclonal; AcP: anticuerpo policlonal.

<sup>1</sup> Cedidos por el Dr. P. Dèspres (Instituto Pasteur, Paris, Francia).

<sup>2</sup> Cedido por el Dr. M. S. Diamond (Washington University School of Medicine, San Luis, EE.UU.).

<sup>3</sup> Cedidos por el Dr. M. A. Jiménez Clavero (CISA, Madrid).

<sup>4</sup> Reactiva frente a IgG de varias especies animales entre las que se encuentran los équidos.

#### **4.9.1 Western blot**

Se utilizó con lisados de células *Sf21* y extractos, crudos y purificados, de larvas infectadas con los baculovirus recombinantes. En el primer caso, las células infectadas fueron despegadas en medio fresco con un raspador, centrifugadas a 250 x g durante 5 min a 4° C y resuspendidas en tampón de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1x cocktail inhibidor de proteasas). Tras 30 min en hielo con el tampón de lisis, se centrifugaron a 7.000 x g y se recolectaron los sobrenadantes.

La obtención de los extractos larvarios crudos y purificados se ha descrito previamente en los apartados 4.7.1 y 4.8, respectivamente. Cuando fue necesario cargar la misma concentración de proteínas, esta se determinó previamente para cada muestra por el método de Bradford (Bradford, 1976). Todas las muestras se mezclaron con tampón de carga de Laemmli (Laemmli, 1970). A no ser que se indique lo contrario, el marcador de peso molecular de proteínas utilizado en todos los casos fue el Prestained de Bio-Rad. Las proteínas se separaron electroforéticamente en condiciones reductoras desnaturizantes en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Se utilizaron geles discontinuos de poli(acrilamida) formados por un gel concentrador al 5% de poli(acrilamida) (Protogel, Conda) y un gel separador a continuación. Este segundo gel contenía 10% o 17% de poli(acrilamida), según se quisiera resolver la proteína E (~ 50 KDa) o el más pequeño DIII (~ 12.5 KDa). Tras la electroforesis las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) que fueron bloqueadas durante 45 min a temperatura ambiente (TA) con tampón salino fosfato que contenía 0.05% Tween 20 (PBST) y 5% de leche desnatada (Nestlé). Las membranas se lavaron dos veces con PBST y se incubaron toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla III) disuelto en PBST al 1% de leche desnatada. Tras dos lavados de 15 min a TA se añadió por 1 h a TA el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa, diluido en PBST-1% leche. Se retiró el secundario y se realizaron 5 lavados más de 15 min. Finalmente, las membranas se revelaron en películas de autorradiografía (Agfa) con una solución 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 2.5 mM luminol, 0.4 mM ácido *p*-cumárico y 0.018% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **4.9.2 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)**

El método de ELISA utilizado ha sido el de detección indirecta de inmunoglobulinas de tipo G (IgG). Se realizó en placas de 96 pocillos (Nunc-Immunsorb) que fueron tapizadas (50 µl por pocillo) durante toda la noche a 4° C o durante 1 h a 37° C con las cantidades correspondientes de cada antígeno, diluidas en tampón de tapizado (0.015 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.030

M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.6). Los antígenos positivos utilizados fueron: virus inactivado (VNOi; apartado 4.3.3) y ambas construcciones recombinantes parcialmente purificadas (rE y rDIII; apartado 4.8). Como control de especificidad se utilizaron antígenos negativos: un lisado de células Vero sin infectar (Ir-Vero; ver 4.3.3) y un procesado de larvas inoculadas con un baculovirus irrelevante (Ir-Bac; ver 4.8). Todas las incubaciones posteriores se llevaron a cabo durante 1 h a 37° C. Las placas fueron bloqueadas con 100  $\mu\text{l}$  por pocillo de solución de bloqueo (SB) que contenía 3% leche en PBST (0.05% Tween 20 en PBS). Se realizaron dos lavados con PBST antes de añadir los sueros (50  $\mu\text{l}$ /pocillo) diluidos en SB. Se retiraron éstos y después de cuatro lavados con PBST se incubaron las placas con los anticuerpos secundarios correspondientes (50  $\mu\text{l}$ /pocillo) diluidos en SB. Se lavaron las placas cuatro veces antes de revelar el resultado con 50  $\mu\text{l}$  por pocillo de tampón fosfato-citrato con 0.5 mg/ml de ortofenilendiamina (OPD; Sigma) y 0.056%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reacción se incubó durante 10 min protegida de la luz y se paró con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3N (50  $\mu\text{l}$ /pocillo). La lectura de las placas se realizó en un espectrofotómetro TECAN Genios a una longitud de onda de 492 nm.

#### 4.9.2.1 Criterio de valoración del ELISA

El criterio para determinar la positividad de una muestra fue el descrito por Martin *et al.* (2000). Para que una muestra fuera considerada positiva la absorbancia de ésta sobre el antígeno positivo (VNOi, rE ó rDIII) debía ser al menos 2 veces mayor ( $>2x$ ) que la absorbancia de un *pool* de sueros negativos sobre el mismo antígeno y, además, la absorbancia sobre el antígeno positivo debía ser al menos el doble de la absorbancia de esa misma muestra sobre el correspondiente antígeno irrelevante (Ir-Vero e Ir-Bac).

#### 4.10 Ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HI)

La capacidad de aglutinar los eritrocitos es característica de muchos flavivirus, entre los que se encuentra el VNO (Clarke y Casals, 1958). Se basa en la interacción entre antígenos virales y proteínas de membrana de las células sanguíneas, de manera que se obtiene una malla aglutinante que impide que precipiten los eritrocitos. El antígeno utilizado consiste en virus obtenido al inocular cerebros de ratones neonatos, purificado mediante gradientes de sacarosa e inactivado por temperatura (Beaty, Calisher y Shope, 1989). Los sueros específicos frente a los antígenos virales reconocen estos antígenos impidiendo la interacción con las proteínas celulares e inhibiendo de esta forma la aglutinación (Beaty, Calisher y Shope, 1989). La inhibición de la hemaglutinación se observa por medio del “botón” de células precipitadas, considerándose el título de HI como el recíproco de la

dilución más alta capaz de inhibir totalmente la hemaglutinación de 4 a 8 unidades de antígeno (Clarke y Casals, 1958). Los resultados de HI mostrados en esta Tesis fueron obtenidos por nuestros colaboradores de la *University of Texas Medical Branch* (UTMB, Texas, EE.UU.).

#### **4.11 Ensayos de neutralización de la actividad viral**

##### **4.11.1 Ensayos de neutralización *in vitro* (PRNT)**

Se realizaron con sueros murinos y equinos. Los sueros de ratones inmunizados con las construcciones recombinantes (ver apartado 4.12.2) se testaron en *pools*, que se establecieron mezclando volúmenes iguales de muestras pertenecientes a animales del mismo grupo de inmunización obtenidas el mismo día. Los sueros equinos de la colección de México se testaron de manera individualizada.

Las muestras se diluyeron en un volumen final de 100  $\mu$ l en EMEM completo sin SFB, desde una dilución inicial 1:10 (suero en medio) a 1:320, siguiendo un patrón de dilución 1:2. Las diluciones de suero se mezclaron con aproximadamente 100 UFP de VNO diluido en 100  $\mu$ l de EMEM (las diluciones finales fueron 1:20 a 1:640). Las mezclas se incubaron durante una hora a 37° C. Células Vero sembradas cercanas a la confluencia en placas de 6 pocillos (35 mm de diámetro, Nunc) fueron inoculadas con las mezclas (200  $\mu$ l/pocillo) para testar su infectividad. En todos los casos se incluyeron controles negativos (medio EMEM) y positivos (mezcla 1:1 de medio EMEM + VNO 1 UFP/ $\mu$ l; 200  $\mu$ l/pocillo). Los pasos siguientes son los ya descritos en el apartado 4.3.2. El título de anticuerpos neutralizantes se estableció como el inverso de la dilución sérica capaz de inhibir la formación de placas en un 90% (PRNT<sub>90</sub>). Estos experimentos se realizaron como mínimo por triplicado.

##### **4.11.2 Ensayos de neutralización *in vivo***

Se realizaron con *pools* de los sueros recolectados antes del desafío de cada grupo de animales inmunizados y de cada grupo control (ver apartado 4.12.2). Estos *pools* fueron incubados durante 1 hora a 37° C puros (1:1), y diluidos (1:100) en PBS estéril, con 100 UFP de VNO (diluciones finales 1:2 y 1:200). Tras la incubación se inyectó la mezcla (10  $\mu$ l/animal) por vía intracraneal (i.c.) en ratones neonatos Swiss de 4 días de edad, con una jeringa de repetición Stepper<sup>TM</sup> Tridak (Indicon Inc.). El grupo de control de buena práctica recibió por vía i.c. suero de ratones pre-inmunes diluido en PBS estéril sin virus. Los animales fueron controlados a diario y aquellos que presentaron síntomas neurológicos evidentes fueron sacrificados.



## 4.12 Experimentos con ratones

La capacidad inmunogénica y protectora de los antígenos recombinantes generados se evaluó en el modelo murino. Todas las cepas clásicas de ratones de laboratorio son susceptibles a la infección por el VNO y el curso de ésta y los signos de enfermedad que presentan son, en ciertos aspectos, similares a los de la infección en humanos (Nalca, Fellows y Whitehouse, 2003). Las inmunizaciones se realizaron en las instalaciones de nuestro animalario y los desafíos en las instalaciones de NSB-3. Todos los experimentos con ratones se realizaron de acuerdo a la legislación vigente (Real Decreto 1201/2005) siguiendo las directrices sobre experimentación animal del Comité de Seguridad Animal del INIA.

Se realizaron dos experimentos:

- Experimento 1: con el objetivo de testar la capacidad inmunogénica y protectora de los antígenos recombinantes parcialmente purificados (rE y rDIII) en ratonas adultas.
- Experimento 2: con el objetivo de evaluar la inmunidad adquirida por ratonas gestantes y la transmisión de ésta a su descendencia.

### 4.12.1 Animales

Se utilizaron hembras de 8 semanas de edad de la cepa Swiss (no consanguínea, *outbred*) de pelaje blanco (Harlan Ibérica), ratones neonatos de esa misma cepa (ver apartado 4.12.2) y ratonas C57BL/6 x DBA2-F1 de pelaje negro, en adelante denominadas B6D2, de 8 semanas (cedidas amablemente por el Dr. A. Gutiérrez, Departamento de Reproducción Animal, INIA). La generación F1 del cruce de dos cepas consanguíneas (*inbred*) C57BL/6 y DBA2 se considera también consanguínea. Se eligieron hembras porque son más dóciles, conviven de manera no violenta, y presentan una morbilidad y mortalidad tras la infección por el VNO similar a la de los machos (Cordoba *et al.*, 2007). Los animales recibieron agua y comida *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad en un fotoperiodo constante 12-12 regulado automáticamente.

### 4.12.2 Inmunizaciones y desafío

#### 4.12.2.1 Experimento 1: vacunación de ratonas adultas

Grupos de seis o siete animales fueron inmunizados por vía intraperitoneal (i.p.) tres veces en intervalos de dos semanas con 2, 10 ó 30 µg de antígeno purificado (rE o rDIII; apartado 4.8) diluidos en PBS estéril (pH 7.4) y mezclados 1:1 con adyuvante de Freund (Freund, Casals y Hosmer, 1937) (Sigma-Aldrich). Se utilizó adyuvante de Freund completo en la primera inmunización e incompleto en las dos siguientes. La mezcla homogénea de

inmunógeno-adyuvante se hizo en dos jeringas de vidrio unidas por un émbolo. Además, se establecieron dos grupos control de seis animales. Los animales del primer grupo control fueron inoculados por vía i.p. con una mezcla de PBS (estéril)-adyuvante y los del segundo grupo sólo con PBS (estéril). El desafío viral se realizó por vía i.p. diez días después de la última inmunización con  $10^6$  UFP/animal de la cepa neurovirulenta del VNO utilizada a lo largo de la Tesis. Tras el desafío los animales fueron controlados a diario y en caso de presentar signos evidentes de enfermedad fueron sacrificados. Los signos de la enfermedad causada por VNO en ratones incluyen: pérdida de peso, pelo erizado, posición encorvada, pérdida de movimientos y parálisis trasera, correlacionados con infección del sistema nervioso central, que es finalmente lo que acaba causando la muerte de los mismos (Shrestha, Gottlieb y Diamond, 2003).

#### **4.12.2.2 Experimento 2: estudio de la transmisión pasiva de la inmunidad**

Cuatro hembras Swiss fueron inmunizadas i.p. por tres veces con la dosis más elevada de cada antígeno recombinante (30  $\mu$ g/ratona), rE (n = 2) y rDIII (n = 2), en paralelo a las inmunizaciones del experimento 1. Días después estas hembras Swiss y hembras B6D2 (pelaje negro) no inmunizadas se cruzaron con machos reproductores de manera que sus partos se produjeran de manera simultánea. En el momento del parto la mitad de las camadas nacidas de hembras Swiss inmunizadas y las nacidas de su correspondiente hembra B6D2 asignada fueron intercambiadas, de forma que cada hembra criara parte de su propia camada y parte de una camada de la otra cepa. En ausencia de pelo las crías de una cepa u otra podían ser diferenciadas por el color de los ojos, oscuros en las crías B6D2. Todas las crías fueron desafiadas i.p. con  $10^6$  UFP/animal entre 13 y 16 días post-parto, mientras que las madres fueron desafiadas i.p. con la misma dosis 14 días después, momento en el que ya se había producido el destete. Los animales fueron observados a diario y aquellos que mostraron signos neurológicos evidentes fueron sacrificados.

#### **4.12.3 Recolección y procesamiento de muestras**

Sólo se recolectó sangre de animales adultos. Fueron sangrados a través de la vena mandibular dos veces: antes del desafío (21 días después de la primera inmunización, 7 días después de la primera inmunización de recuerdo, *boost*), y catorce días después de éste. Las hembras gestantes se sangraron una vez antes del parto, en el mismo punto que el sangrado pre-desafío del resto de ratonas (21 días después de la primera inmunización, 7 días después del primer *boost*). La sangre se dejó coagular durante toda la noche a 4° C y el día siguiente se

separó el plasma del suero mediante centrifugación a 2.000 x g durante 10 min. Los sueros se conservaron a -20° C hasta su uso.

Se recolectaron los cerebros de todos los animales y se homogenizaron en PBS estéril (700 µl) utilizando bolas metálicas y el TissueLyser II de Qiagen. Tras la homogenización, se clarificaron las muestras con una centrifugación a 300 x g durante 10 min. A partir de los sobrenadantes se extrajo directamente el ARN (ver apartado 4.4.1b) o se congelaron a -80° C para un uso posterior.

Tanto la sangre como los cerebros se recolectaron y procesaron en condiciones de esterilidad en cabina de flujo utilizando material estéril.

#### **4.13 Aplicaciones y programas bioinformáticos**

En esta Tesis se utilizaron diversas aplicaciones bioinformáticas de acceso libre obtenidas en las webs [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch) y [www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk). Para el análisis de las secuencias y diseño de los clonajes se utilizaron los programas Chromas (versión 1.43), Genedoc y pDraw32.

#### **4.14 Métodos estadísticos y análisis de los datos**

Los valores representados en las gráficas corresponden a la media de los datos  $\pm$  el valor de la desviación estándar de la muestra. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa informático SPSS versión 17 (SPSS Inc.). Aquellas variables que siguieron una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov) fueron sometidas a análisis de la varianza (ANOVA) aplicando la corrección de Bonferroni. Las diferencias entre grupos fueron consideradas significativas estadísticamente cuando el valor de  $p$  fue menor de 0.05. Las variables que no siguieron necesariamente una distribución normal fueron sometidas al test U de Mann-Whitney al que se aplicó la corrección de Bonferroni. Fueron consideradas significativas las diferencias entre grupos cuando el valor de  $p$  fue menor de 0.002. Las variables cualitativas se analizaron según una distribución  $X^2$  o mediante el test exacto de Fisher-Snedecor.

#### **4.15 Medios, disoluciones y tampones**

- **Tripsina:** 100 ml de tripsina 10x (Gibco, Invitrogen), 100 ml de PBS estéril 10x, diluidos en H<sub>2</sub>O miliQ estéril hasta un volumen final de 1000 ml. Conservada en fracciones a -20° C hasta su uso.

- **Medio Terrific Broth (TB):** se obtiene de mezclar las soluciones A y B después de ser autoclavadas. Solución A: 12 gr de bacto triptona, 24 gr de extracto de levadura y 4 ml de glicerol diluidos en 900 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Solución B: 2.31 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12.54 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> diluidos en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada.
- **Tampón TAE:** 40 mM Tris-acetato sódico pH 8.0, 1 mM EDTA.
- **PBS:** 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl. Ajustar pH a 7.4. Solución autoclavada en caso de precisarse estéril.
- **Tampón fosfato:** 7.1 gr de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 5.55 gr de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O y 116.9 gr de NaCl se diluyen en 500 ml de H<sub>2</sub>O hasta obtener una solución homogénea. Después se filtra por filtros de 0.45 µm. Se obtiene así un tampón fosfato 0.08 M con NaCl 4 M. Ajustar pH a 7.4.
- **Azul de Coomassie:** 0.25% de azul de Coomassie (Sigma-Aldrich), 45% de metanol (Merck) y 10% de ácido acético (Merck) en H<sub>2</sub>O destilada. La solución se filtra por papel de filtro para eliminar impurezas.
- **Tampón de electroforesis de proteínas:** 192 mM glicina, 25 mM Tris-HCl pH 8.8, 1% SDS.
- **Tampón de transferencia de proteínas:** 192 mM glicina, 25 mM Tris-HCl pH 6.3, 20% metanol.
- **Tampón fosfato-citrato:** 0.054 M ácido cítrico, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O.





# **Resultados**





## 5. Resultados

### 5.1 Caracterización de una colección de sueros equinos

La colección de sueros equinos ( $n = 288$ ) procedente de México nos fue facilitada por nuestra colaboradora la Dra. E. Loza-Rubio (INIFAP, México D.F., México). Las muestras se recolectaron entre los meses de marzo y abril de 2006 en los estados mexicanos de Puebla ( $n = 138$ ) y Chiapas ( $n = 150$ ). Estos estados se localizan respectivamente en las regiones central y meridional del país (Figura 10). Los sueros fueron recolectados en las municipalidades de Pichucalco ( $17^{\circ} 30' N$ ,  $93^{\circ} 07' W$ ) y Juárez ( $17^{\circ} 36' N$ ,  $93^{\circ} 10' W$ ) del estado de Chiapas y en Hueytamalco ( $19^{\circ} 56' N$ ,  $97^{\circ} 17' W$ ), Ayotoxco ( $20^{\circ} 05' N$ ,  $97^{\circ} 24' W$ ) y San José Acateno ( $20^{\circ} 07' N$ ,  $97^{\circ} 12' W$ ) del estado de Puebla. Las condiciones climáticas son similares en todas las municipalidades, con temperaturas medias entre  $22^{\circ} C$  y  $27^{\circ} C$  y tasas de pluviometría media entre  $2.500$  y  $3.000 \text{ mm}^3$  por año. Todas las localizaciones se encuentran entre  $120$  y  $300$  m sobre el nivel del mar, excepto Hueytamalco que se encuentra a  $914$  m de altitud ([www.earth.google.com](http://www.earth.google.com)).

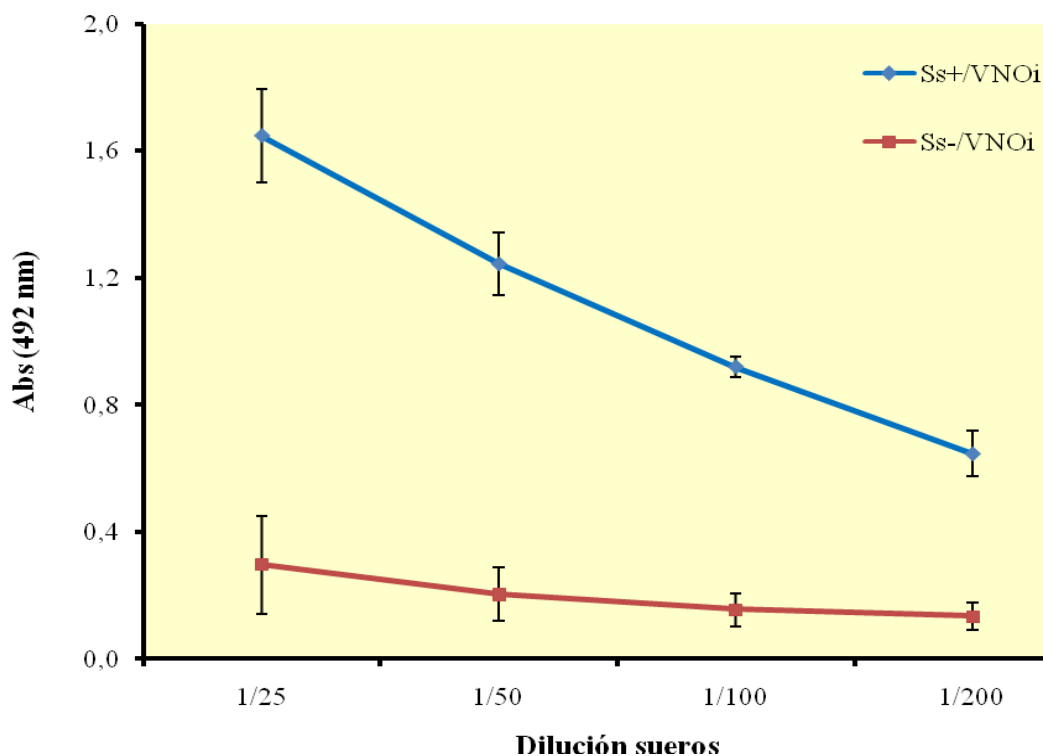


**Figura 10. Mapa de México.** Se muestran las localizaciones donde la actividad del VNO había sido detectada previamente (círculos rojos) en el momento de recolección de las muestras. Las municipalidades de Puebla y Chiapas muestreadas se marcan con puntos azules y negros, respectivamente.

## Resultados

La caracterización serológica de la colección se llevó a cabo mediante ELISA y ensayos de neutralización en placa (PRNT) frente al VNO. La presencia de inmunoglobulinas IgG anti-VNO fue analizada en todas las muestras siguiendo un protocolo de ELISA indirecto utilizando virus inactivado, VNOi, como antígeno (ver apartado 4.3.3). Este es el antígeno de uso más habitual en los laboratorios. Los títulos de ELISA se expresan como P/N que es la relación entre la absorbancia del suero problema sobre el antígeno positivo (antígeno inactivado, VNOi en este caso) con respecto a la absorbancia de un *pool* de sueros negativos sobre el mismo antígeno. Las condiciones óptimas de concentración del antígeno (VNOi ~ 0.5 µg/pocillo) y de dilución de los sueros (Figura 11) se determinaron utilizando sueros equinos previamente caracterizados, cedidos amablemente por el Dr. J. G. Estrada-Franco (UTMB, Texas, EE.UU.) y por el Dr. A. Garmendia (Storrs University, Connecticut, EE.UU.).

Los sueros se testaron en duplicado sobre VNOi y sobre antígeno irrelevante (Ir-Vero) para demostrar la especificidad de la reacción. Los ensayos se realizaron por triplicado.



**Figura 11. Determinación de la dilución óptima de sueros equinos utilizando como antígeno VNOi (0.5 µg/pocillo).** La línea y rombos azules indican los valores de absorbancia de los sueros positivos (Ss+) y la línea y cuadros rojos los de los sueros negativos (Ss-).

La capacidad neutralizante de los sueros se confirmó mediante PRNT. Los títulos de neutralización se calcularon como el recíproco de la dilución de suero, diluido al menos 1/40, que reducía la formación de placas virales en un porcentaje  $\geq 90\%$  (PRNT<sub>90</sub>) respecto de un control establecido.

Los resultados de ELISA y PRNT obtenidos se resumen en la Tabla IV. El 31.6% (91/288) de los sueros ensayados resultó positivo en ELISA. La seroprevalencia fue más alta en Chiapas (53.3%, 80/150; valor P/N promedio 3.6, rango 2.03-9.8) que en Puebla (8%, 11/138; valor P/N promedio 3.6, rango 2.5-7.3). No se observaron diferencias de seroprevalencia entre las municipalidades dentro de cada estado.

Todas las muestras IgG-positivas de Chiapas, excepto una, fueron también positivas cuando se ensayaron mediante PRNT (promedio PRNT<sub>90</sub> 435; rango 40 a  $\geq 1250$ ). Por su parte, todas las muestras IgG-positivas de Puebla fueron positivas mediante PRNT (promedio PRNT<sub>90</sub> 430; rango 130 a  $\geq 1250$ ). Una muestra de Puebla que era PRNT<sub>90</sub>-positiva resultó ser IgG-negativa. Hecho que también se observó en quince muestras de Chiapas. En cualquier caso, la concordancia observada entre ambas pruebas (ELISA y PRNT<sub>90</sub>) fue buena ( $\kappa = 0.87$ ).

**Tabla IV. Comparativa de resultados obtenidos al testar los sueros equinos mediante ELISA (VNOi como antígeno) y PRNT.**

Localización (n° animales)	IgG(+)/PRNT(+) (%)	IgG(-)/PRNT(+) (%)	IgG(+)/PRNT(-) (%)	IgG(-)/PRNT(-) (%)
Chiapas (150)	79 (52.6%)	1 (0.7%)	15 (10%)	55 (36.7%)
Puebla (138)	11 (8.0%)	0 (0%)	1 (0.7%)	126 (91.3%)
Total (288)	90 (31.3%)	1 (0.3%)	16 (5.6%)	181 (62.8%)

Tomando la PRNT como la prueba diagnóstica de referencia, la sensibilidad y especificidad del ELISA basado en VNOi fue del 84.9% y del 99.5%, respectivamente. Aunque la seroprevalencia fue ligeramente inferior en animales de menos de 2 meses de edad (16%), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación a la edad o el sexo de los animales.

En el momento del muestreo (primavera 2006), aunque existía constancia de las actividad de otros flavivirus (Ulloa *et al.*, 2003; [www.dgepi.salud.gob.mx/sinave](http://www.dgepi.salud.gob.mx/sinave)), la presencia de VNO no había sido detectada en estas regiones. Debido a la reactividad cruzada que pueden presentar los sueros frente a los diversos flavivirus circulantes en la zona, se

analizó un subgrupo de 138 muestras (82 IgG y/o PRNT positivas y 56 negativas) mediante ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI, ver apartado 4.10) frente al VNO, el VESL y el virus Ilheus (VILH) (Tabla V). La presencia de VESL y de VILH había sido descrita previamente en México y se sabe que al menos el primero de éstos es capaz de infectar equinos (Sabattini, Avilés y Monath, 1998; Ulloa *et al.*, 2003). Los ensayos fueron realizados por nuestros colaboradores en la UTMB (Texas, EE.UU.). Los resultados obtenidos concluyeron que el 31.9% (44/138) de los sueros analizados eran VNO específicos, bien porque sólo reaccionaron frente a éste, o bien porque los títulos de HI para el VNO fueron al menos 4 veces superiores a los obtenidos frente al VESL o al VESL y al VILH. La especificidad del 28.3% (39/138) de los sueros no pudo ser definida, ya que mostraron títulos de HI similares para el VNO y el VESL o para el VNO, el VESL y el VILH. Dos de estos sueros presentaron títulos bajos (1/40) únicamente frente al VESL. Por otro lado, en el 39.8% (55/138) de los sueros restante no se detectó ninguna reactividad, ni tampoco en un suero que había resultado IgG-positivo en ELISA pero PRNT-negativo (Tabla V).

De los datos obtenidos se deduce que de las 68 muestras IgG y PRNT-positivas, 29 reconocieron también a otros flavivirus, mientras que 39 de ellas pudieron ser definidas como VNO-específicas. De igual manera, de las 13 muestras que habían resultado sólo positivas por PRNT, 8 reconocieron flavivirus inespecíficamente y 5 fueron VNO-específicas. En definitiva, tras analizar los resultados obtenidos con las tres pruebas diagnósticas se pudo establecer que 44 muestras eran VNO-específicas y 54 muestras no presentaban reactividad frente a ninguno de los flavivirus analizados.

Tabla V. Resultados cruzados obtenidos mediante ELISA, PRNT y HI.

	VNO específicos (44/138, 31.9%)				Flavivirus inespecífico (39/138, 28.3%)				Negativos (55/138, 39.8%)
	VNO (23/44, 52.3%)	VNO + VESL (16/44, 36.4%)	VNO + VESL + VILH (5/44, 11.3%)	Total	VNO + VESL (24/39, 61.6%)	VNO + VESL + VILH (13/39, 33.3%)	VESL (2/39, 5.1%)	Total	
IgG(+)/PRNT(+) (68/138, 49.3%)	20/68 (29.4%)	14/68 (20.6%)	5/68 (7.4%)	39/68 (57.4%)	16/68 (23.5%)	13/68 (19.1%)	0	29/68 (42.6%)	0
IgG(+)/PRNT(-) (1/138, 0.7%)	0	0	0	0	0	0	0	0	1/1 (100%)
IgG(-)/PRNT(+) (13/138, 9.4%)	3/13 (23.1%)	2/13 (15.4%)	0	5/13 (38.5%)	8/13 (61.5%)	0	0	8/13 (61.5%)	0
IgG(-)/PRNT(-) (56/138, 40.6%)	0	0	0	0	0	0	2/56 (3.6%)	2/56 (3.6%)	54/56 (96.4%)

VNO, virus del Nilo Occidental; VESL, virus de la encefalitis de San Luis; VILH, virus de Ilheus; ELISA, inmunoensayo enzimático; PRNT, ensayo de neutralización de la infectividad en placa; HI, ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Los datos se expresan como números de muestras positivas/total de muestras, con los porcentajes correspondientes dados entre paréntesis.

## 5.2 Generación de los baculovirus recombinantes

### 5.2.1 Predicciones de secuencia

Las secuencias nucleotídicas del fragmento soluble de la proteína E y del dominio III de la misma se tradujeron a secuencias aminoacídicas con la aplicación disponible en el ExPASy Proteomics Server ([www.expasy.ch/tools](http://www.expasy.ch/tools)) y se determinaron el peso molecular (Pm) y el punto isoeléctrico (pI) aproximados de cada una de las construcciones recombinantes (Tabla VI). Empleando otras aplicaciones informáticas de acceso libre ([www.cbs.dtu.dk/services](http://www.cbs.dtu.dk/services)) se obtuvieron las predicciones de péptidos señal (SignalP 3.0) (Bendtsen *et al.*, 2004) y de dominios trans-membrana hidrofóbicos (TMHMM Server 2.0) que pudieran afectar al posterior proceso de expresión de las proteínas recombinantes.

**Tabla VI. Peso molecular y punto isoeléctrico teórico de las proteínas recombinantes obtenidas.**

Subunidad	Peso molecular ~ (KDa)	Punto isoeléctrico ~ (pI)
rE	49.6	7.7
rDIII	12.4	6.9

Los datos se obtuvieron utilizando la aplicación *Compute pI/Mw* ([www.expasy.org/tools](http://www.expasy.org/tools)).

Las predicciones de secuencia reconocieron el péptido señal de la melitina (22 primeros aminoácidos de cada construcción) y no definieron ninguna región hidrofóbica transmembrana en el resto de las secuencias aminoacídicas de cada recombinante (Figura 12).

En el proceso de generación de los bácmidos recombinantes (rBac-Es y rBac-DIII) el gen responsable de la expresión de la polihedrina baculoviral se sustituyó por las secuencias recombinantes correspondientes, conservándose la secuencia promotora del mismo ( $P_{PH}$ ; ver apartado 4.6). El material génico regulado por este promotor se transcribe en gran cantidad en la fase final del ciclo de replicación de baculovirus (Kelly, King y Possee, 2007).

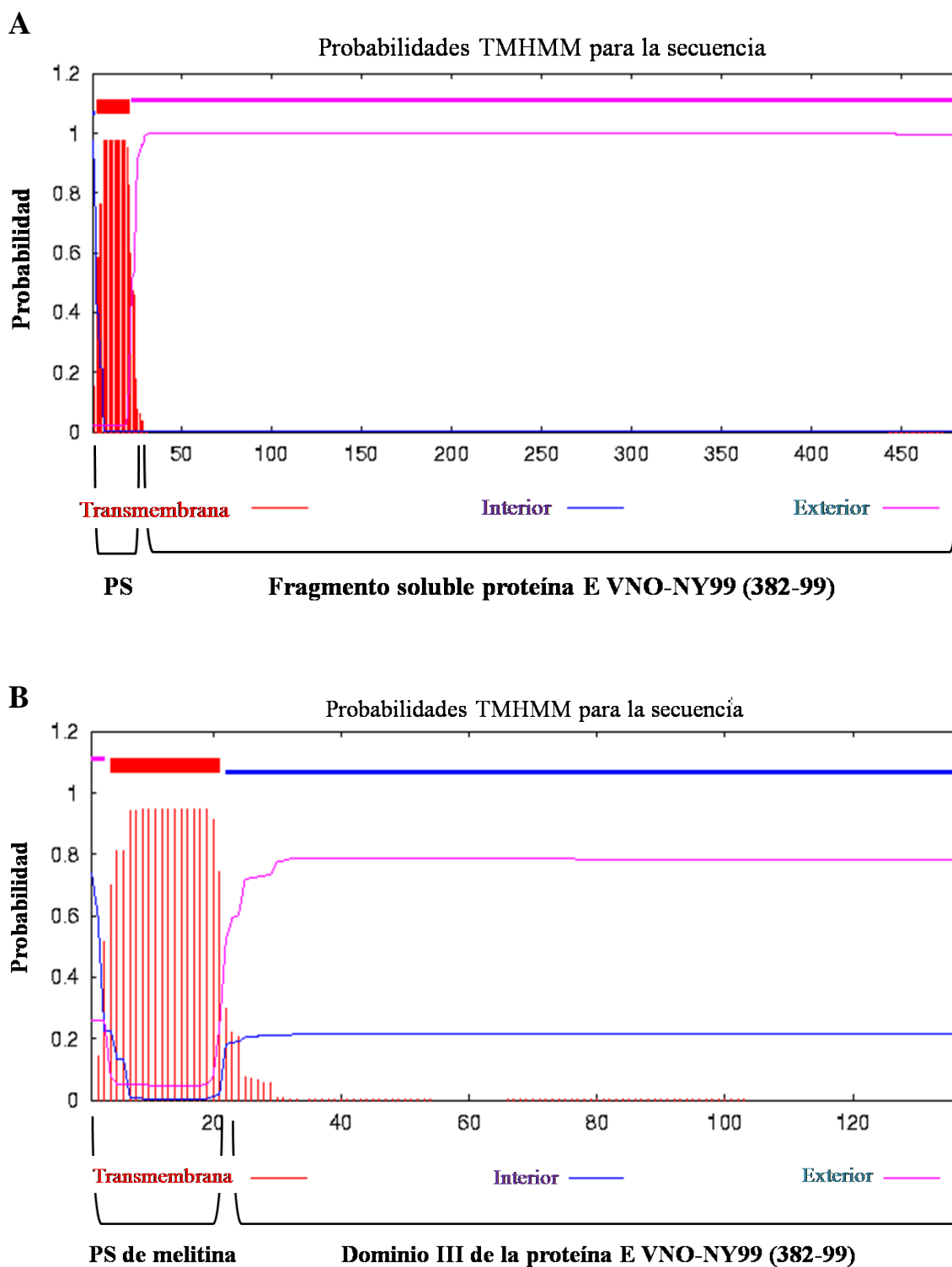


Figura 12. Predicción de dominios hidrofóbicos transmembrana en las secuencias aminoacídicas de rE (A) y rDIII (B).

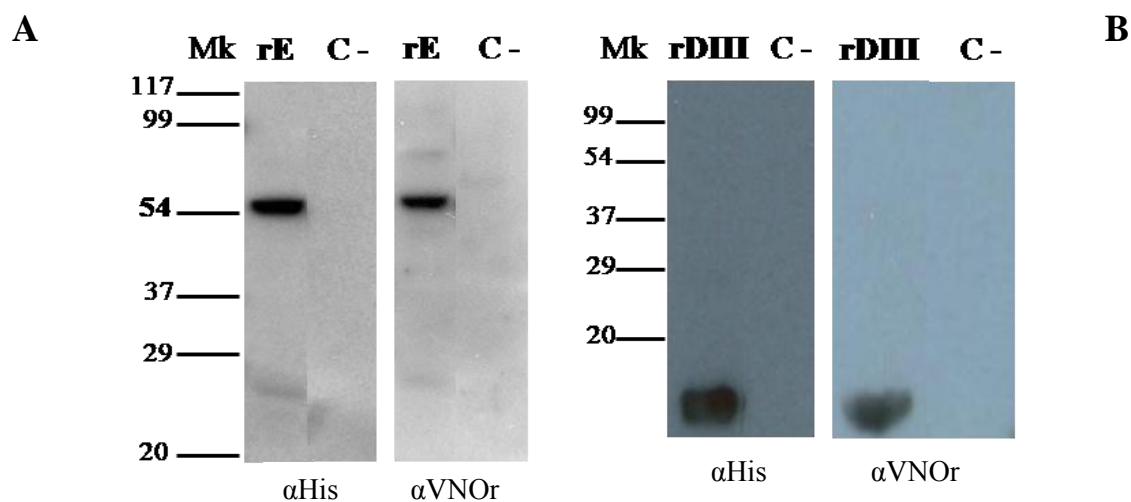
### 5.2.2 Titulación de los baculovirus recombinantes

Los bácmidos recombinantes transfectados en células *Sf21* confluentes en un 80% se expresaron generando los baculovirus infecciosos recombinantes que se recuperaron en los

sobrenadantes de los cultivos. Como era de esperar, el título inicial de estos baculovirus fue bajo y hubo de ser amplificado mediante pases sucesivos en células *Sf21* hasta alcanzar títulos de  $10^7$  UFP/ml y  $5 \times 10^7$  UFP/ml para rBac-Es y rBac-DIII, respectivamente.

### 5.3 Expresión de las proteínas recombinantes en células de insecto

Los baculovirus recombinantes se utilizaron para infectar (m.d.i. 0.1) células de insecto *Sf21*. La correcta expresión de las dos construcciones recombinantes en los lisados de células infectadas recolectados 72 h.p.i. se confirmó mediante *Western blot* con un anticuerpo monoclonal anti-His ( $\alpha$ His) y un anticuerpo policlonal de ratón anti-VNO específico ( $\alpha$ VNO<sub>r</sub>) (Figura 13), tal y como se describe en el apartado 4.9.1 de esta Tesis.



**Figura 13. Detección de la expresión de las proteínas recombinantes rE (A) y rDIII (B) en células de insecto.** Los anticuerpos  $\alpha$ His y  $\alpha$ VNO de ratón se añadieron diluidos 1/5.000 y 1/300, respectivamente. El anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa se incubó a 1/5.000. Mk, marcador de peso molecular de proteínas; rE, lisado de células infectadas con rBac-Es; rDIII, lisado de células infectadas con rBac-DIII; C- lisado de células *Sf21* sin infectar.

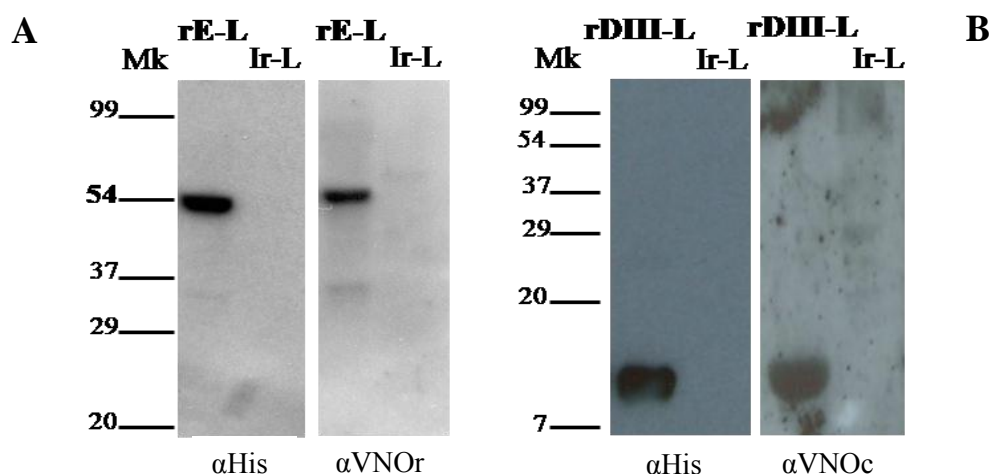
El anticuerpo policlonal (AcP) anti-VNO detectó específicamente ambas subunidades con los tamaños esperados. Igual sucedió con el AcM anti-His, indicando que el epítipo de 6 histidinas que se había insertado en el extremo C-terminal de cada construcción se expresaba correctamente en células junto al resto de la secuencia aminoacídica correspondiente.

La cantidad de proteína recombinante presente en los extractos de células *Sf21* infectadas no fue suficiente como para poder ser detectada mediante tinción con azul de Coomassie tras la electroforesis en gels de poliacrilamida (datos no mostrados).



#### 5.4 Expresión de las proteínas recombinantes en larvas

Tras comprobar la presencia de los productos recombinantes expresados en células se procedió a inocular larvas del lepidóptero *Trichoplusia ni* con cada uno de los baculovirus recombinantes generados. Las larvas se inocularon en grupos de 10 con aproximadamente  $10^5$  UFP/larva de rBac-Es o rBac-DIII. Las infecciones se dejaron progresar durante 72 horas, momento en el que se procesaron las larvas (ver apartado 4.7.1a). La expresión de rE y rDIII se detectó mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal (AcM) anti-His y anticuerpos policlonales anti-VNO de ratón ( $\alpha$ VNO<sub>r</sub>) y caballo ( $\alpha$ VNO<sub>c</sub>) previamente caracterizados (Figura 14). Ambas construcciones recombinantes se detectaron a los tamaños esperados y conservaron los epítomos de His al ser expresadas en las larvas. La cantidad de proteína total en los extractos crudos se cuantificó mediante reacción de Bradford en  $\sim 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .



**Figura 14. Detección de rE (A) y rDIII (B) en extractos crudos de larvas.** El AcM  $\alpha$ His se incubó diluido 1/5.000 y el AcP de ratón ( $\alpha$ VNO<sub>r</sub>) o caballo ( $\alpha$ VNO<sub>c</sub>) diluido 1/300. El anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa se incubó a 1/5.000. Mk, marcador de peso molecular; rE-L, extracto crudo de larvas inoculadas con rBac-Es; rDIII, extracto crudo de larvas inoculadas con rBac-DIII; Ir-L, extracto crudo de larvas inoculadas con un baculovirus silvestre (*Bac-wt*), que se utilizó como control negativo.

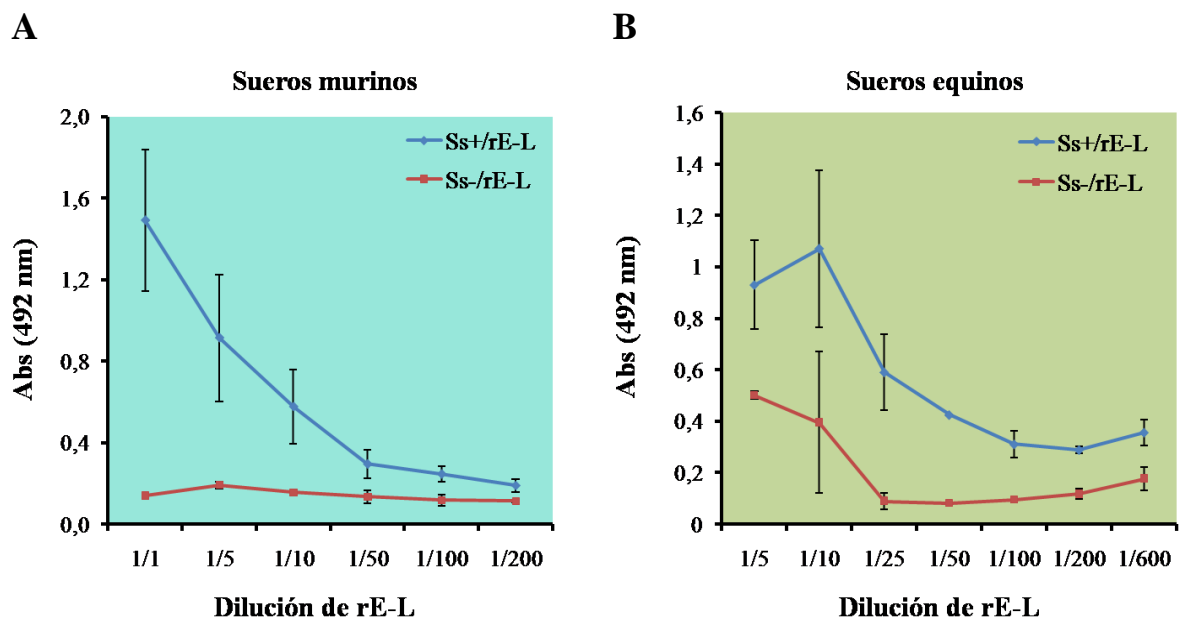
#### 5.5 Determinación de la capacidad antigénica de los extractos crudos de larvas infectadas con los baculovirus recombinantes

Dado que los extractos crudos contenían proteínas inespecíficas, con el fin de determinar la concentración óptima de proteínas a utilizar se tapizaron placas de ELISA con diluciones decrecientes de los extractos, desde sin diluir ( $\sim 500 \mu\text{g}/\text{pocillo}$ ) hasta una dilución 1/600 ( $\sim 0,8 \mu\text{g}/\text{pocillo}$ ) en solución carbonato-bicarbonato. Para la puesta a punto del ensayo

## Resultados

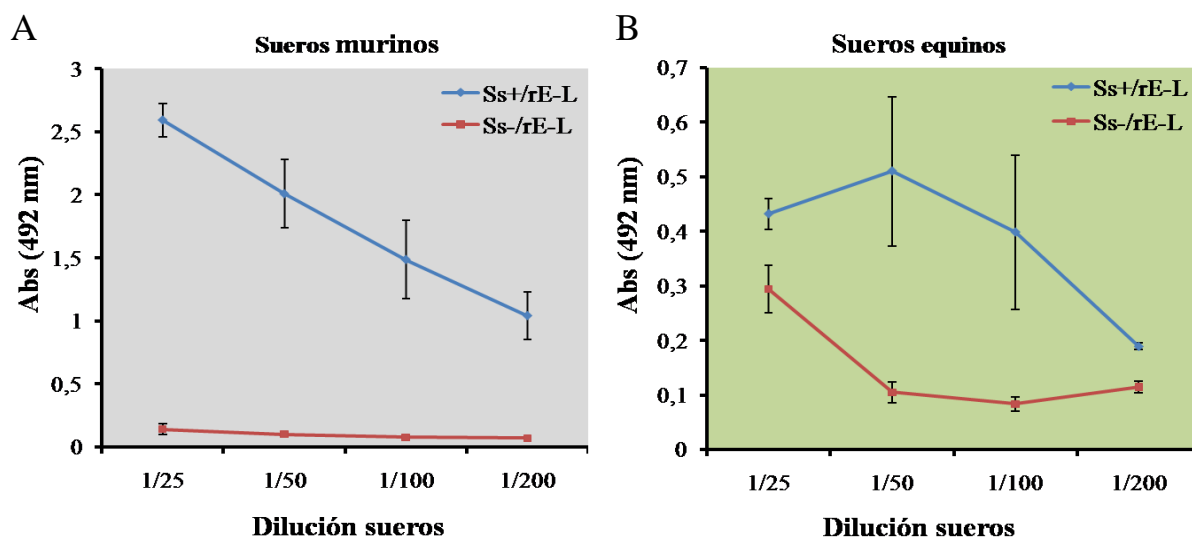
se utilizaron 5 sueros negativos y 5 positivos previamente caracterizados seleccionados aleatoriamente de la colección de sueros murinos del laboratorio (Cordoba *et al.*, 2007; Blázquez y Saiz, 2010) y 5 sueros positivos y 5 negativos de équidos provenientes de la batería de sueros mexicanos caracterizados previamente (ver apartado 5.1). Los ensayos se revelaron, respectivamente, con un anticuerpo anti-IgG de ratón y con proteína G, asociados a peroxidasa, diluidos 1/3.000 y 1/5.000 (apartado 4.9.2). Tal y como se muestra en la Figura 15, con los sueros murinos los mejores resultados se obtuvieron utilizando en extracto sin diluir, (rango  $8.5 \leq P/N \leq 13.0$ ), mientras que la dilución óptima para testar sueros equinos fue de 1/25 (rango  $6.0 \leq P/N \leq 7.8$ ). Dado que el fondo experimental obtenido con los sueros equinos era elevado (datos no mostrados), estos se pre-incubaron con extracto de larvas sin inocular (Ir-L) a una dilución 1/25 antes de ser añadidos a las placas.

El extracto crudo de larvas inoculadas con rBac-DIII no funcionó adecuadamente como antígeno en ELISA (datos no mostrados).



**Figura 15. Determinación de la dilución óptima de rE-L con sueros de ratón (A) y con sueros equinos (B).** Los sueros de ratón se testaron diluidos 1/50 y los de caballo 1/100. En cada caso las líneas y rombos azules indican los valores de absorbancia (Abs) sobre rE-L de los sueros positivos (Ss+) y las líneas y cuadros rojos las de los sueros negativos (Ss-).

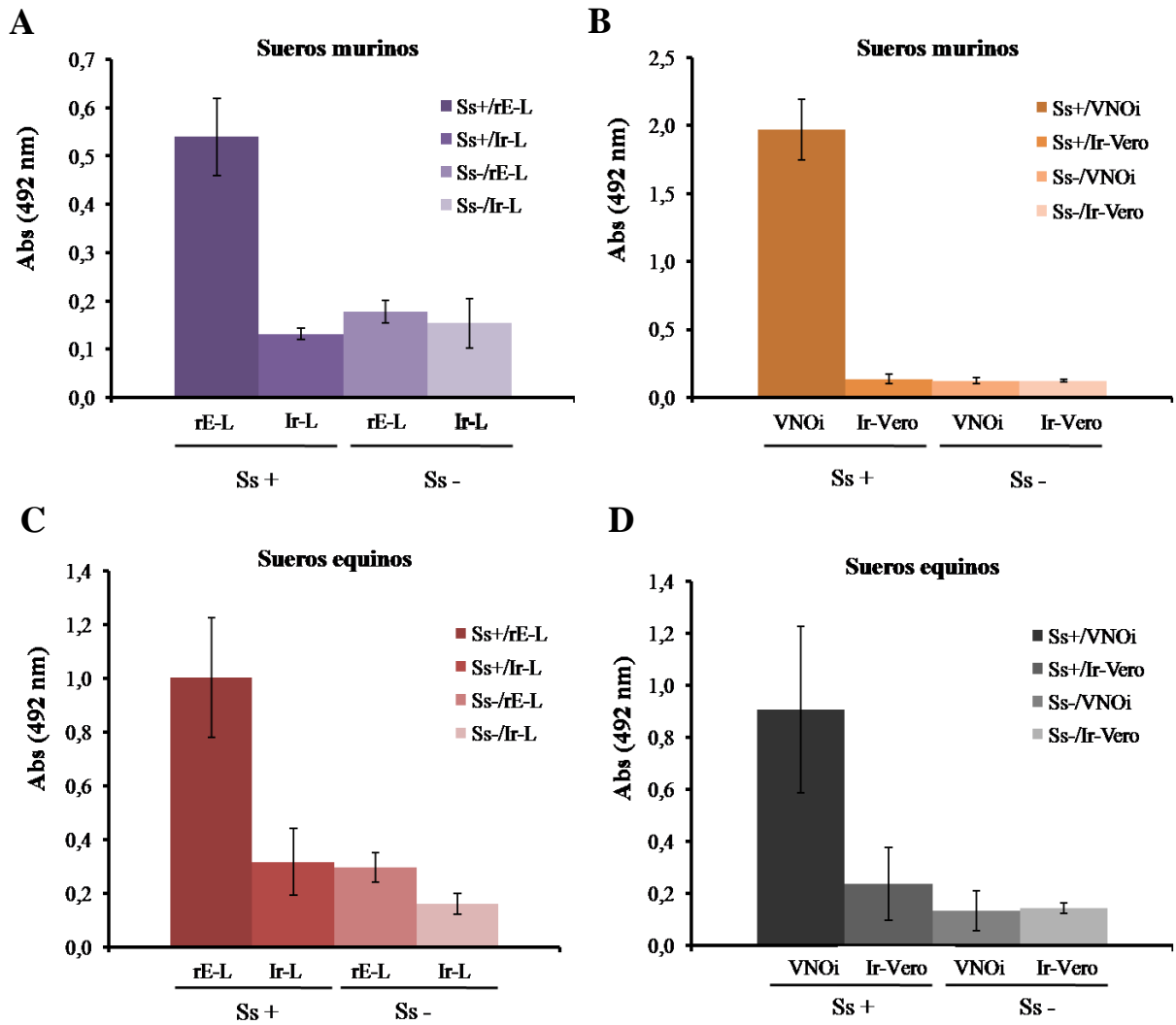
Tras determinar la cantidad óptima de rE-L en ELISA se procedió a optimizar la dilución de los sueros en el ensayo. Para ello se incubaron los sueros de ratón y caballo diluidos desde 1/25 a 1/200 sobre placas tapizadas con rE-L a la dilución óptima previamente establecida, 1/1 ó 1/25, respectivamente.



**Figura 16. Optimización de la dilución de sueros murinos (A) y equinos (B) sobre rE-L.** En cada caso la línea y rombos azules indican los valores de Abs de los sueros positivos (Ss+) a las distintas diluciones testadas; la línea y cuadros rojos representan los de sueros negativos (Ss-).

La reactividad de los sueros positivos de ratón a cualquiera de las cuatro diluciones analizadas (1/25 a 1/200) fue elevada (Figura 16A; Abs.  $\geq 1.0$ ; respecto a la Abs. de los sueros negativos  $\leq 0.1$ ). Los sueros equinos negativos incubados a la dilución más baja (1/25) reaccionaron de manera inespecífica ( $0.25 \leq \text{Abs.} \leq 0.34$ ), a pesar de pre-incubarlos con Ir-L antes de ser añadidos. Al diluir los sueros los fondos se redujeron, de manera que se estableció que la dilución óptima era de 1/50 (Figura 16B). Así pues, se determinó que las diluciones séricas óptimas eran de 1/200 para los sueros murinos y de 1/50 para los sueros equinos.

Para comparar la antigenicidad del extracto rE-L con el antígeno de uso habitual (VNOi) los sueros se testaron en paralelo sobre ambos antígenos. Para definir la especificidad de la reacción se incluyeron los correspondientes antígenos control (Ir-L e Ir-Vero). La reactividad de los sueros, murinos y equinos, fue siempre superior cuando se utilizó VNOi. En cualquier caso, tanto los sueros positivos murinos (Figura 17A) como equinos (Figura 17C) reaccionaron con el componente VNO-específico de rE-L.



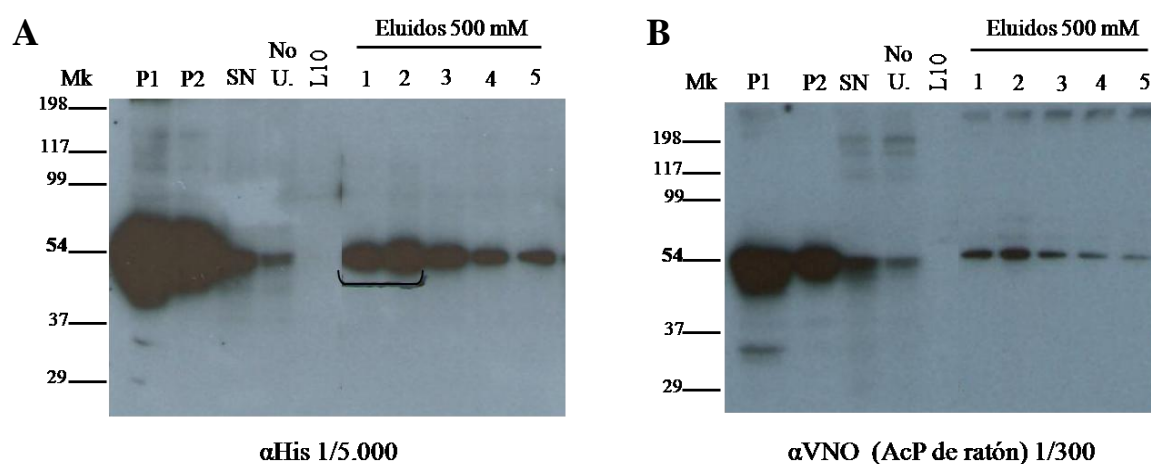
**Figura 17. Comparativa de la reactividad sobre rE-L y VNOi.** Valores de Abs obtenidos utilizando extracto crudo rE-L y VNOi como antígenos (A y B, sueros de ratón; C y D, sueros equinos). Los sueros de ratón se testaron a una dilución 1/200 y los sueros equinos a 1/50. Estos últimos se preincubaron con Ir-L antes de ser añadidos sobre la placa (ver apartado 5.5). Los sueros positivos (Ss+) y los sueros negativos (Ss-) aparecen indicados en las figuras.

Dado el rendimiento obtenido y las concentraciones de extracto óptimas establecidas los datos indican que los extractos crudos provenientes de 10 larvas inoculadas con rBac-Es permitían analizar unas 4.500-5.000 muestras equinas de forma individualizada.

### 5.6 Purificación de las proteínas recombinantes

Con el fin de mejorar los resultados obtenidos con los extractos crudos, se procedió a purificar las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad por medio del epítipo de 6-His que portaban en sus extremos C-terminales. Para ello, el primer paso consistió en comprobar que los extractos homogenizados de ambas construcciones eran

solubles en imidazol, lo que facilitó el proceso de purificación ya que este compuesto no desnaturaliza las proteínas. El protocolo de purificación aplicado a ambos extractos larvarios es el descrito en el apartado 4.8 de esta Tesis. Para seguir el proceso de purificación se recolectaron muestras en cada etapa del mismo y la presencia o no de las proteínas recombinantes en cada una de éstas se determinó mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal anti-His y un anticuerpo policlonal de ratón anti-VNO específico (Figuras 18 y 19).

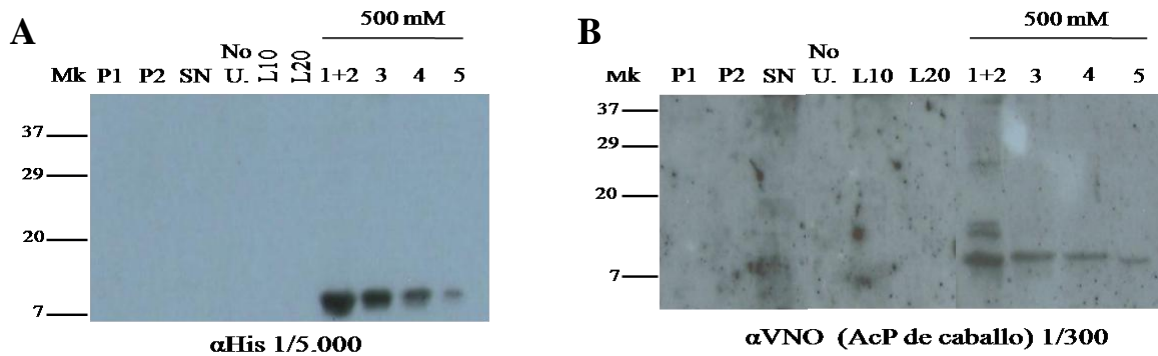


**Figura 18. Seguimiento del proceso de purificación de rE utilizando un anticuerpo  $\alpha$ His (A) y uno  $\alpha$ VNO de ratón (B).** Mk, marcadores de masa molecular; P1, sedimento 1; P2, sedimento 2; SN, sobrenadante que se carga en la columna; No U., fase no unida; L 10, lavado con solución 10 mM de imidazol; 1-5, fracciones eluidas.

A pesar de haber clonado sólo el fragmento soluble de la proteína E, y de que su síntesis estuviera regulada por un péptido señal de secreción, se observó que durante el procesamiento para su purificación (ver apartado 4.8) gran parte de ésta quedaba retenida en aglomerados celulares. Los intentos de solubilizar los sedimentos originados durante el protocolo de purificación (P1 y P2) con diversos detergentes no mejoraron el rendimiento del proceso (datos no mostrados).

En contraste, cuando se purificó el rDIII, de menor tamaño y no glicosilado, éste apenas quedó retenido en los sedimentos originados y pudo ser recuperado en mayor cantidad que rE (Figura 19).

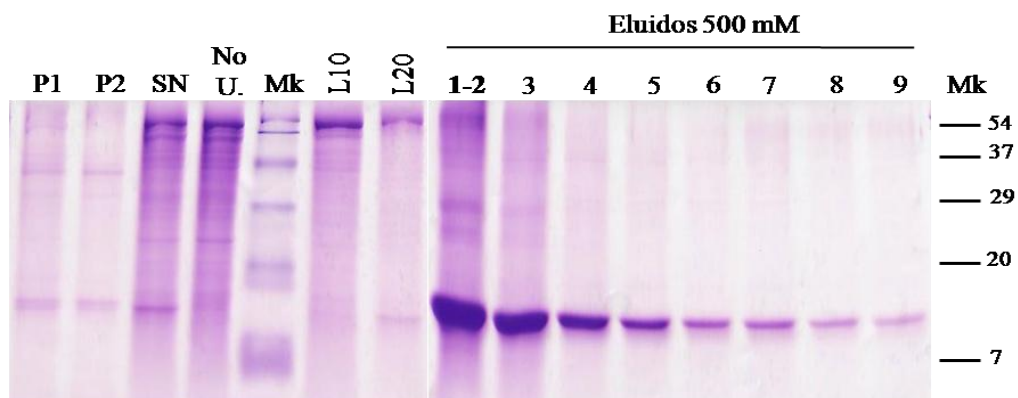
Resultados



**Figura 19. Seguimiento del proceso de purificación de rDIII detectado con un anticuerpo  $\alpha$ His (A) y un  $\alpha$ VNO de caballo (B).** Mk, marcador de proteínas; P1, sedimento 1; P2, sedimento 2; SN, fase sobrenadante que se carga en la columna; No U., fase no unida; L 10, lavado con solución 10 mM de imidazol; L 20, lavado 20 mM imidazol; 1+2, fracciones eluidas 1 y 2 unidas; 3-5, resto de fracciones eluidas.

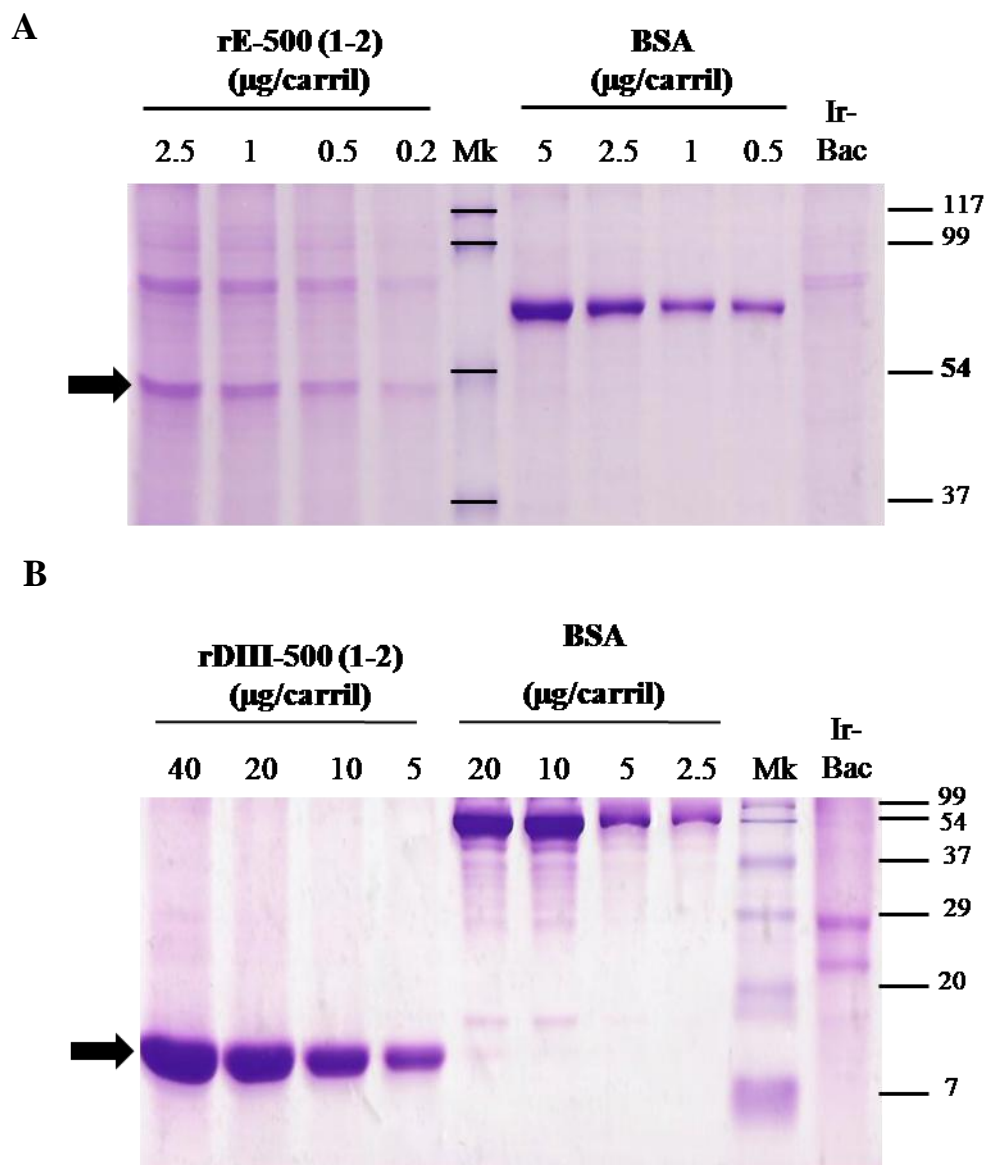
La cantidad de proteína específica purificada, estimada mediante el método de Bradford, en las 2 primeras fracciones (3 ml totales) eluidas con 500 mM de imidazol fue de 1 mg/ml y > 2 mg/ml de rE y rDIII, respectivamente, de modo que el rendimiento fue de aproximadamente 0.5 mg (rE) y 1 mg (rDIII) por larva inoculada con el baculovirus correspondiente.

En cualquier caso, la purificación fue parcial, tal y como demuestra la presencia de especies no específicas observadas tras el análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las distintas fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de rDIII (Figura 20).



**Figura 20. Tinción con azul de Coomassie de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de rDIII.** Se analizaron 20  $\mu$ l/carril de cada fracción. Mk, marcador de peso molecular de proteínas; P1, sedimento 1; P2, sedimento 2; SN, fase sobrenadante aplicada a la columna; No U., fase no unida; L 10, lavado con solución 10 mM de imidazol; L 20, lavado 20 mM imidazol; 1+2, fracciones eluidas 1 y 2 unidas; 3-9, resto de fracciones eluidas.

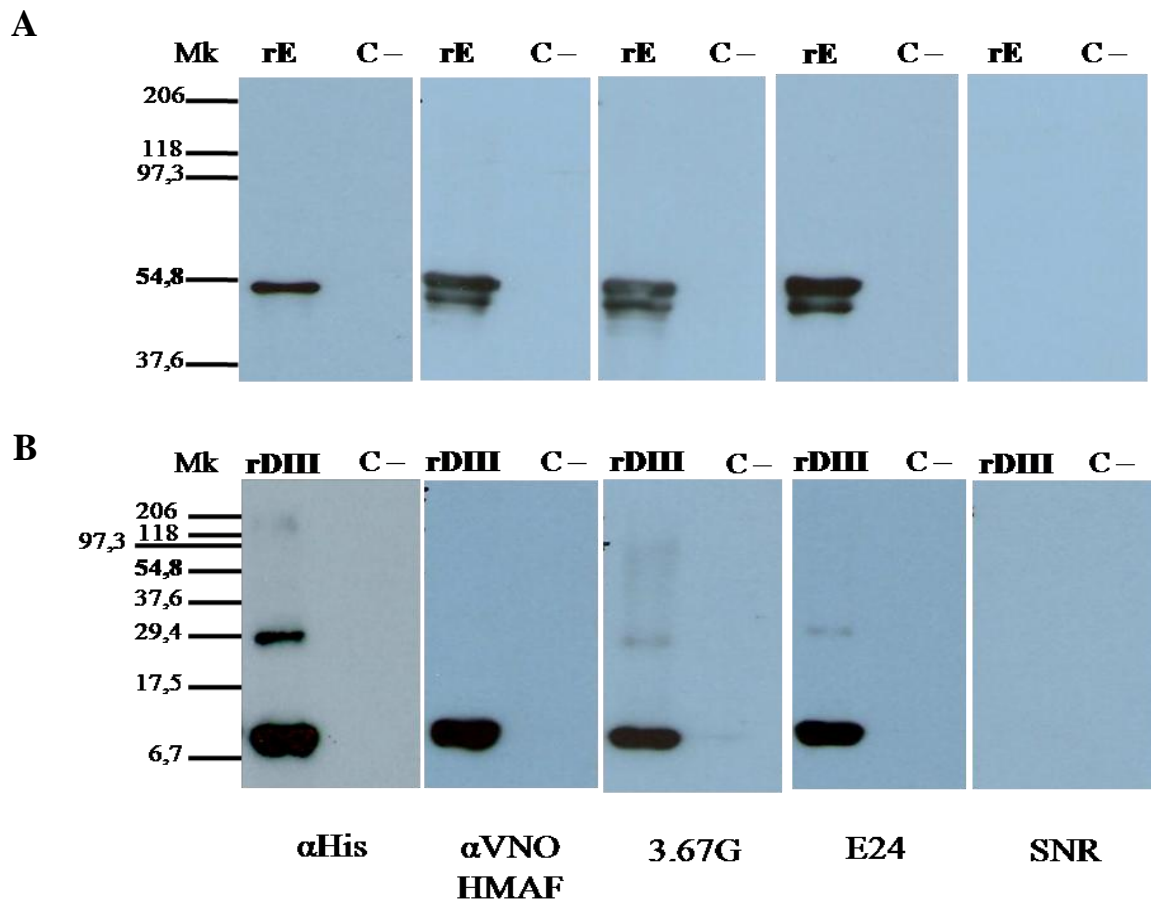
El rendimiento siempre fue mayor en el caso de rDIII, tal y como se observa en la Figura 21. La concentración aproximada de proteína parcialmente purificada se determinó por comparación con patrones de concentración conocida de BSA.



**Figura 21.** Comparativa de la concentración de las dos primeras fracciones eluidas durante el proceso de purificación de rE (A) y de rDIII (B) con respecto a concentraciones conocidas de BSA ( $\mu\text{g}/\text{carril}$ ). Las flechas negras indican la posición de las proteínas recombinantes. Mk, marcador de peso molecular de proteínas; Ir-Bac, fracción 500-1 de un purificado procedente de 10 larvas inoculadas con un baculovirus irrelevante (Bac-*wt*) procesadas siguiendo el mismo protocolo que las proteínas purificadas.

### 5.6.1 Detección de las proteínas purificadas

La detección de las proteínas recombinantes generadas se llevó a cabo mediante *Western blot* con una serie de anticuerpos monoclonales y con un líquido ascítico anti-VNO (Figura 22) como se describe en el apartado 4.9.1. Como control negativo se utilizó un suero policlonal de ratones no infectados (SNR) y como controles de especificidad se incluyeron extractos de larvas infectadas con un baculovirus irrelevante y procesadas de igual modo (Ir-Bac). Tanto el anticuerpo anti-His como los anticuerpos VNO-específicos reconocieron ambas proteínas recombinantes rE y rDIII a los tamaños esperados (50 KDa y 12 KDa, respectivamente). Cuando se utilizaron anticuerpos anti-VNO se observó la presencia de una doble banda en el caso de rE, la cual ya se intuía en la tinción Coomassie (ver Figura 21).

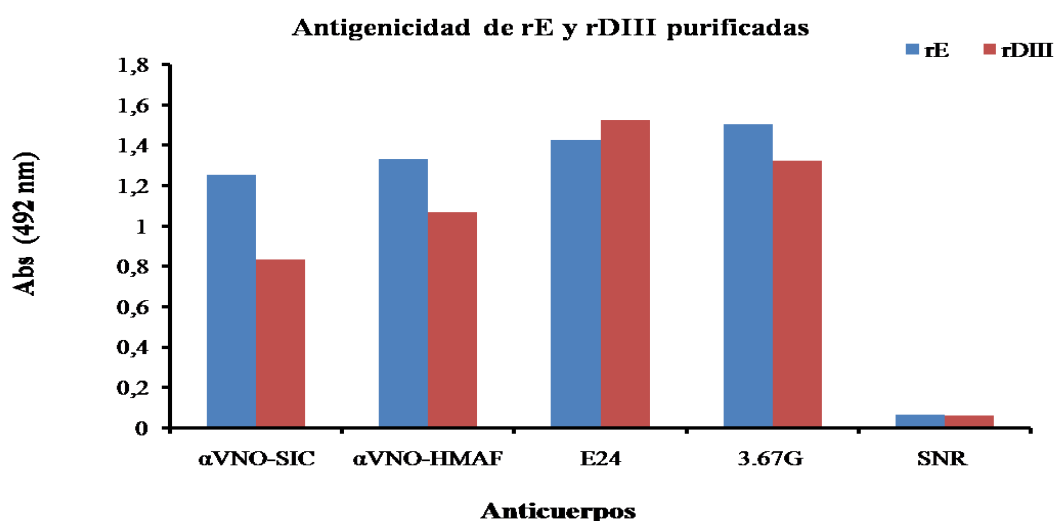


**Figura 22. Detección de rE (A) y rDIII (B) utilizando una serie de anticuerpos monoclonales (αHis, 3.67G y E24) y policlonales (αVNO-HMAF, fluido hiper-inmune anti-VNO de ratón; SNR suero negativo de ratón).** Mk, marcador de proteínas; rE, proteína E purificada (fracciones eluidas 1-2); rDIII, subunidad rDIII purificada (fracciones eluidas 1-2); C-, extracto purificado de larvas inoculadas con un Bac-*wt* irrelevante (fracción eluida 1).



### 5.7 Determinación de la capacidad antigénica de las subunidades purificadas

La capacidad antigénica de ambas construcciones recombinantes se evaluó mediante ensayos de inmuno-detección enzimática (ELISA). Placas inmuno-absorbentes se tapizaron con rE ó rDIII (0.5  $\mu\text{g/pocillo}$ ) y se incubaron con varios anticuerpos anti-VNO específicos (Tabla III, en Materiales y Métodos). En todos los casos, excepto con el anticuerpo monoclonal E24, que es DIII-específico y reconoce la región lateral de éste (Oliphant *et al.*, 2005), la reactividad de rE fue mayor (Figura 23), muy probablemente debido al mayor número de epítomos susceptibles de ser reconocidos que alberga. Los sueros se incubaron a 1/1.000, excepto 3.67G y SNR que se incubaron a 1/100. Estas diluciones fueron previamente establecidas como las óptimas para este tipo de análisis (datos no mostrados).



**Figura 23.** Antigenicidad de rE (columnas azules) y rDIII (columnas rojas). Las placas se tapizaron con 0.5  $\mu\text{g/pocillo}$  de cada una de las recombinantes.  $\alpha\text{VNO-SIC}$ , suero inmune de conejo inoculado con el VNO;  $\alpha\text{VNO-HMAF}$ , fluido hiper-inmune anti-VNO de ratón; E24, AcM DIII-específico; 3.67G, AcM comercial anti-E; SNR, suero negativo de ratón.

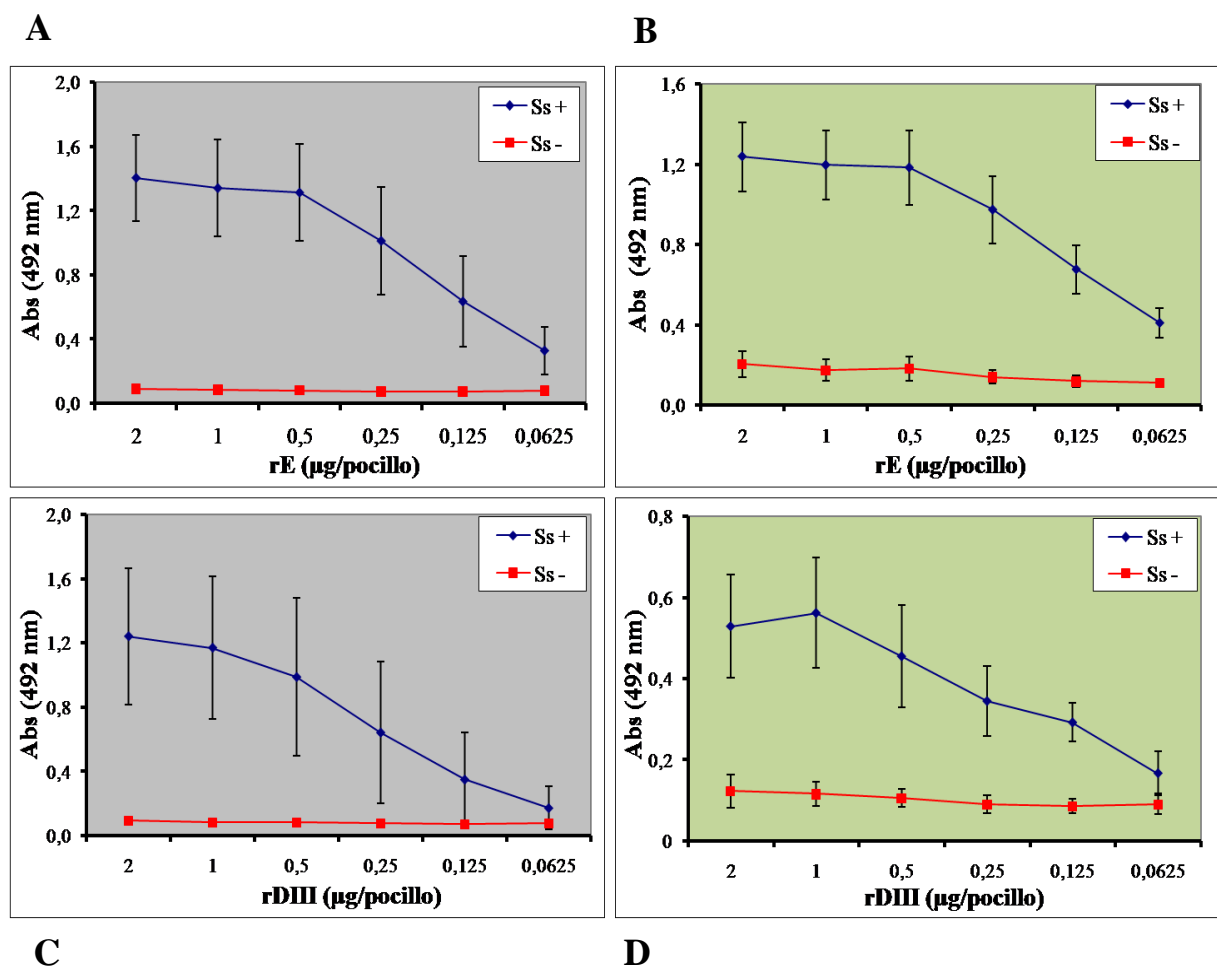
### 5.8 Optimización de la concentración de rE y rDIII en ELISA

Una vez demostrada la viabilidad antigénica de ambas subunidades parcialmente purificadas, se tapizaron placas con cantidades decrecientes de las mismas (desde 2  $\mu\text{g/pocillo}$  hasta 0.0625  $\mu\text{g/pocillo}$ ) para estandarizar su uso con sueros de ratón y con sueros equinos diluidos 1/100. Se utilizaron sueros de ratón positivos ( $n = 5$ ) y negativos ( $n = 5$ ) de la colección del laboratorio (Cordoba *et al.*, 2007; Blázquez y Saiz, 2010), y sueros equinos positivos ( $n = 5$ ) y negativos ( $n = 5$ ) de la colección procedente de México previamente caracterizada (ver apartado 5.1). Los sueros murinos procedían de infecciones de ratones de

## Resultados

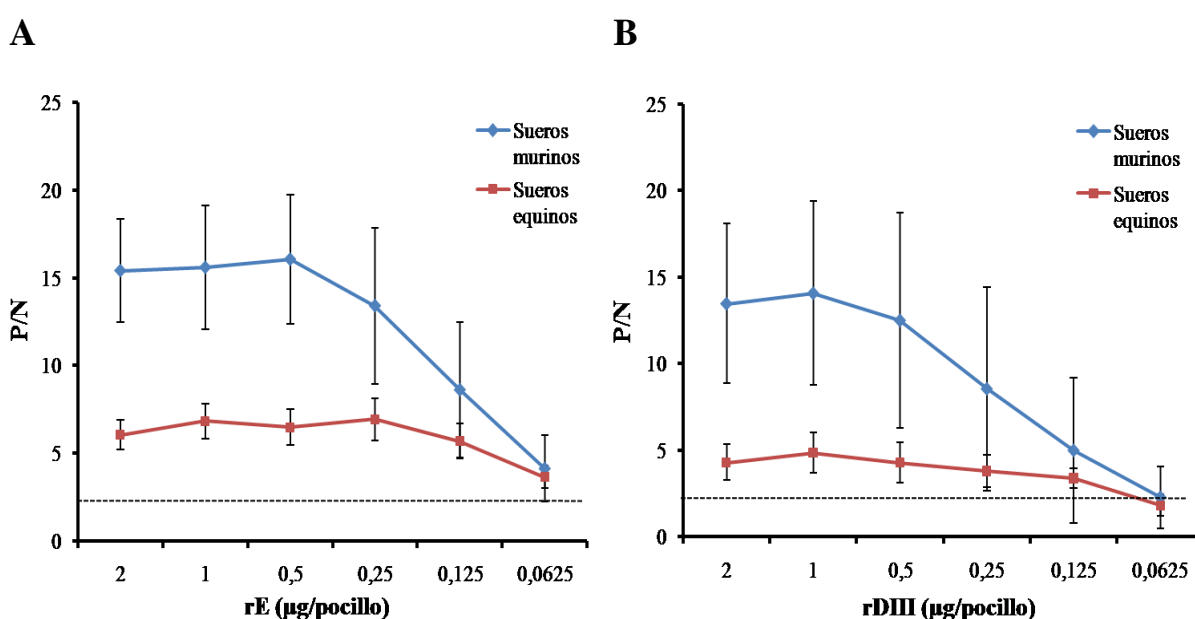
experimentación (cepas BALB/c o Swiss) y los equinos de infecciones naturales. En todos los casos las reactividades fueron mayores y los fondos inespecíficos menores con los sueros de ratón.

La reactividad de los sueros positivos murinos y equinos sobre rE fue  $\geq 1.0$  hasta 0.5  $\mu\text{g}$  rE/pocillo (Figuras 24 A y B, respectivamente). Mientras que los resultados obtenidos con los sueros murinos y equinos utilizando rE como antígeno fueron similares, la reactividad de los sueros equinos con rDIII fue menor que la mostrada por los sueros murinos. Además, en ambos casos se observó una mayor variabilidad, tal y como muestran las desviaciones estándar de los experimentos (Figura 24 C y D).



**Figura 24. Optimización de la concentración de antígeno purificado rE y rDIII para uso en ELISA.** Valores de Absorbancia usando rE como antígeno con los sueros murinos (A) y equinos (B). Valores de Absorbancia usando rDIII como antígeno con los sueros murinos (C) y equinos (D). En todos los casos las reactividades de los sueros positivos (Ss+) aparecen indicados con líneas y puntos azules y las de los sueros negativos con líneas y puntos rojos (Ss-).

De los resultados obtenidos se estableció que la concentración óptima de antígeno rE era de 0.5  $\mu\text{g/pocillo}$  para ensayar sueros de ambas especies (Figura 25A). A esta concentración los valores de P/N de los sueros positivos y negativos presentaron las mayores diferencias (sueros murinos:  $13.2 \leq \text{P/N} \leq 20.6$ ; sueros equinos:  $5.4 \leq \text{P/N} \leq 7.8$ ). Dado el rendimiento alcanzado en los procesos de producción y purificación, los datos indican que se podrían testar hasta 1.000 muestras individuales por cada larva inoculada. En el caso del antígeno rDIII, la concentración óptima se estableció en 1  $\mu\text{g/pocillo}$  (Figura 25B). Los valores de P/N a esta concentración fueron de  $6.6 \leq \text{P/N} \leq 20.4$  para los sueros murinos y de  $3.2 \leq \text{P/N} \leq 6.0$  para los equinos.

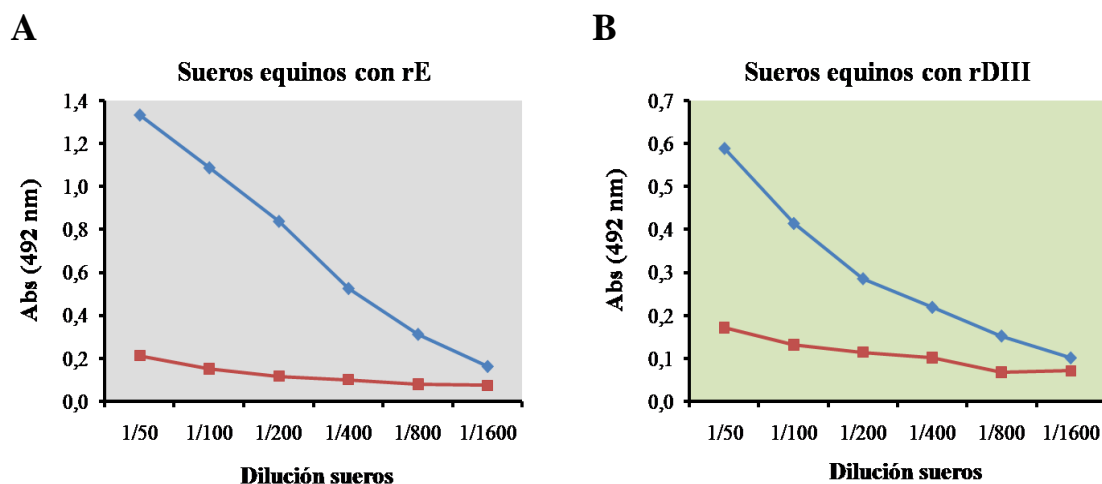


**Figura 25. Relación entre los valores de Absorbancia de los sueros positivos y los negativos (P/N) utilizando como antígenos rE (A) y rDIII (B).** En ambos casos las líneas y puntos azules representan los valores P/N de los sueros murinos y las líneas y puntos rojos los valores P/N de los sueros equinos, testados sobre cantidades decrecientes de antígeno. La línea horizontal discontinua indica el umbral de positividad del ensayo ( $\text{P/N} > 2$ ).

### 5.9 Optimización de la dilución de sueros equinos

Una vez establecidas las concentraciones óptimas de los antígenos recombinantes se determinó la dilución óptima de los sueros equinos mediante el ensayo de distintas diluciones de mezclas de sueros previamente caracterizadas, desde 1/50 a 1/1.600. Las diluciones óptimas resultaron ser de 1/100 y 1/50 para rE y rDIII, respectivamente (Figura 26).

Igual que se observó previamente, la reactividad fue menor con rDIII que con rE, probablemente por la presencia de un mayor número de epítomos en la última.



**Figura 26. Determinación de la dilución óptima de los sueros equinos sobre rE (A) y rDIII (B).** En cada caso, las líneas y rombos azules indican los valores de Abs de los sueros positivos (Ss+) y las líneas y cuadrados rojos los de los sueros negativos (Ss-).

### 5.10 Validación de las subunidades proteicas recombinantes obtenidas como antígenos de ELISA

Con el objetivo de validar la utilidad de las proteínas recombinantes generadas como antígenos se compararon los resultados obtenidos con los ELISA desarrollados y optimizados en este trabajo con los del ELISA basado en el uso de VNOi. Se testaron un total de 60 sueros, 18 de los cuales eran negativos (IgG-/PRNT-). En estos ensayos las placas se tapizaron como se ha descrito previamente (Ebel *et al.*, 2002), de manera que cada muestra se testó en duplicado sobre los antígenos específicos e individualmente sobre una cantidad equivalente del antígeno control correspondiente (Ir-Bac o Ir-Vero, según se tratara de antígenos recombinantes o VNOi). Aquellos sueros cuya absorbancia con el antígeno positivo no fuera de al menos 2 veces la absorbancia obtenida con el antígeno control fueron considerados inespecíficos (ver apartado 4.9.2.1). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Tomando como referencia el ensayo PRNT (Beaty, Calisher y Shope, 1989), los resultados de ELISA obtenidos con cada antígeno se compararon con los obtenidos con esta prueba para calcular su especificidad y sensibilidad. La especificidad está determinada por el número de sueros que son a la vez IgG-negativos y PRNT-negativos respecto del total de sueros negativos (definidos éstos como PRNT-negativos al ser PRNT la prueba de referencia). La sensibilidad está determinada por el número de sueros que son a la vez IgG-positivos y

PRNT-positivos respecto del total de sueros PRNT-positivos (definidos éstos como PRNT-positivos al ser PRNT la prueba de referencia).

### 5.10.1 Antígeno VNOi

El ELISA basado en antígeno viral inactivado (VNOi) reconoció 40 de los 42 sueros positivos, mostrando un 95.2% de sensibilidad con respecto a PRNT<sub>90</sub> y un 94.4% de especificidad, ya que un suero positivo en ELISA fue negativo por PRNT. La concordancia entre ambas pruebas fue del 95% (Tabla VII).

**Tabla VII.** Comparación de los resultados del ELISA-VNOi y PRNT<sub>90</sub>.

		Reactividad por PRNT <sub>90</sub>		TOTAL ELISA
		Positivo	Negativo	
Resultados según ELISA con VNOi	Positivo	40	1	41
	Negativo	2	17	19
<b>TOTAL PRNT<sub>90</sub></b>		42	18	<b>60</b>

Concordancia 95% (kappa = 0.88)

### 5.10.2 Antígeno rE

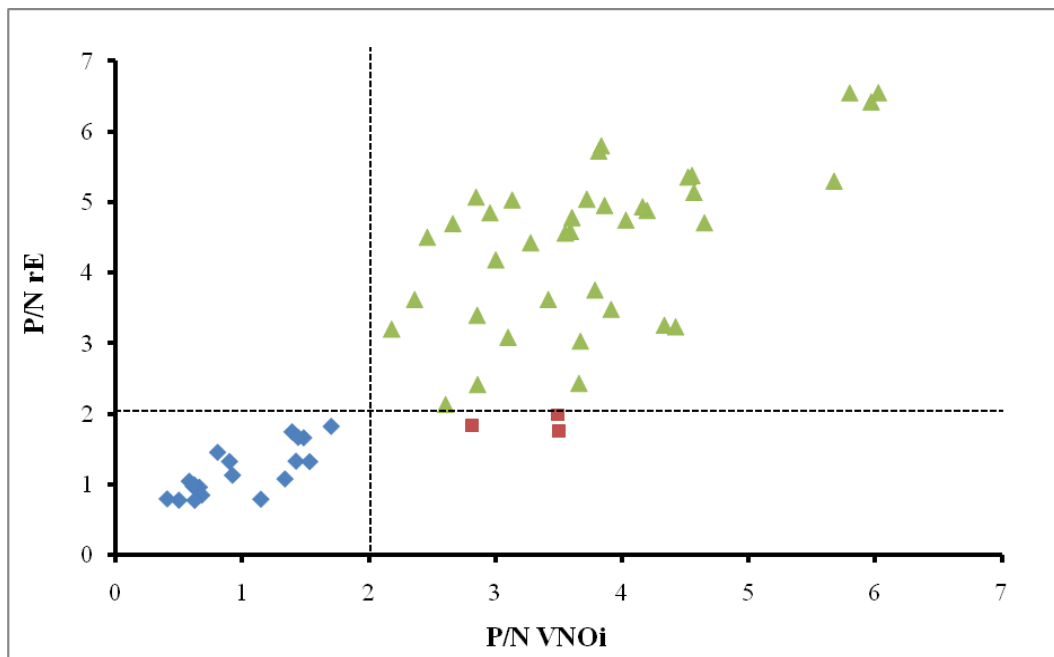
Con respecto a la prueba de referencia (PRNT), la concordancia del ELISA basado en rE fue del 90% (kappa = 0.78), con una especificidad del 94.4% (igual a la de VNOi), ya que sólo un suero positivo en ELISA fue negativo por PRNT (Tabla VIII). Por su parte, la sensibilidad fue del 88.1%; sin embargo, cabe resaltar que los valores P/N de los sueros discordantes (P/N promedio = 1.9; d.e. = 0.12) fueron ligeramente inferiores al valor umbral del ensayo (P/N > 2) y que tres de ellos presentaron, además, títulos de neutralización muy bajos (PRNT<sub>90</sub> = 40).

Al comparar ambos ensayos de ELISA, y considerando el ensayo basado en VNOi como referente, la especificidad y la sensibilidad de rE como antígeno fueron del 100% y del 92.5%, respectivamente (concordancia 95%; kappa = 0.89). Además, los tres únicos sueros discordantes entre ambos ensayos presentaron valores de P/N cercanos al umbral del ensayo (P/N > 2; Figura 27).

**Tabla VIII.** Comparación de los resultados del ELISA-rE-y PRNT<sub>90</sub>.

		Reactividad por PRNT <sub>90</sub>		TOTAL ELISA
		Positivo	Negativo	
Resultados según ELISA con rE	Positivo	37	1	38
	Negativo	5	17	22
TOTAL PRNT <sub>90</sub>		42	18	60

Concordancia 90% (kappa = 0.78)



**Figura 27.** Valores de P/N con VNOi y rE. Sueros negativos, rombos azules; sueros positivos, triángulos verdes; sueros positivos sólo con VNOi, cuadrados rojos. Las líneas discontinuas horizontal y vertical marcan, respectivamente, el umbral del ensayo ( $P/N > 2$ ) con rE y con VNOi.

### 5.10.3 Antígeno rDIII

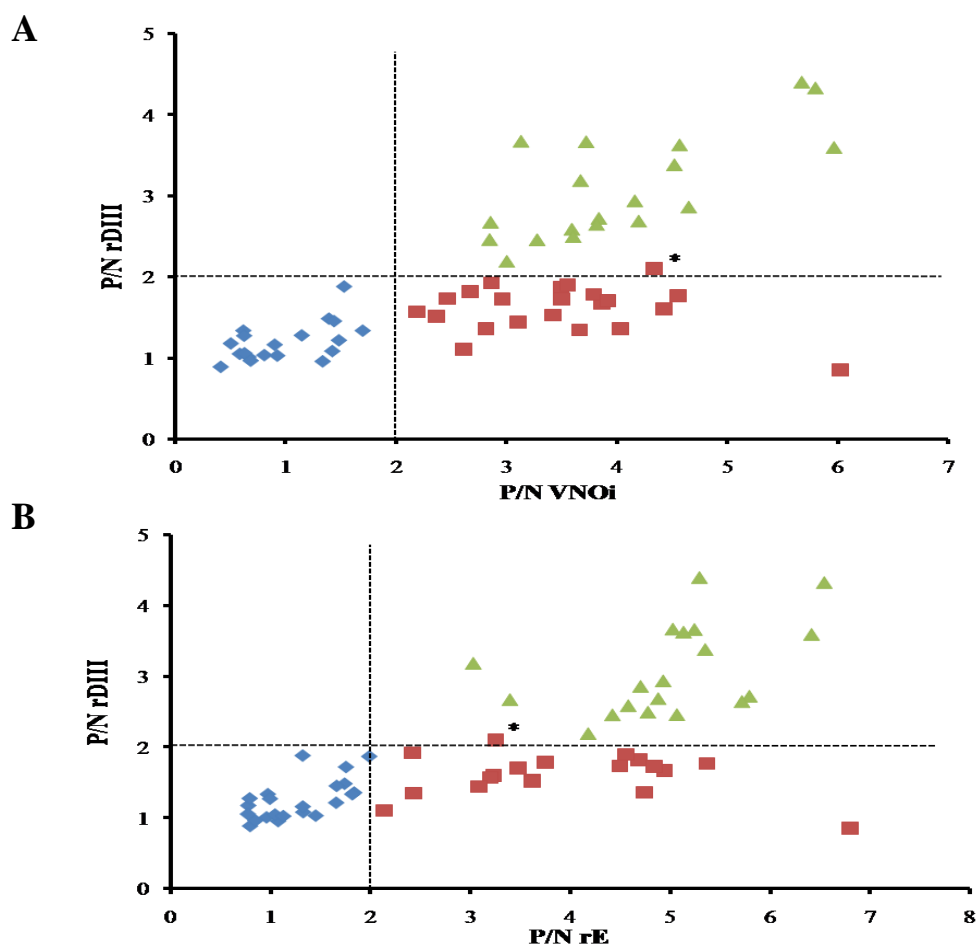
A diferencia de los dos antígenos anteriores, la especificidad del ELISA basado en rDIII fue del 100%, pero apenas rindió un 45.2% de sensibilidad, ya que sólo fue capaz de detectar 19/42 sueros positivos. La concordancia entre rDIII-ELISA y PRNT fue del 62% (kappa = 0.33) (Tabla IX).

**Tabla IX.** Comparación de los resultados del ELISA-rDIII y PRNT<sub>90</sub>.

Resultados según ELISA con rDIII		Reactividad por PRNT <sub>90</sub>		TOTAL ELISA
		Positivo	Negativo	
	Positivo	19	0	19
	Negativo	23	18	41
<b>TOTAL PRNT<sub>90</sub></b>		42	18	<b>60</b>

Concordancia 62% (kappa = 0.33)

La reactividad de los sueros positivos con rDIII (P/N promedio = 3.0; d.e. = 0.65) fue menor que con rE (P/N promedio = 4.4; d.e. = 1.1) o VNOi (P/N promedio = 3.8; d.e. = 0.95). En la Figura 28 se observa la menor sensibilidad de detección usando rDIII en comparación con la obtenida con VNOi (A) o con rE (B).



**Figura 28.** Valores de P/N con rDIII en comparación con los obtenidos con VNOi (A) o con rE (B). Sueros negativos, rombos azules; sueros positivos, triángulos verdes; sueros positivos sólo con VNOi o rE, pero no con rDIII, cuadrados rojos. La línea horizontal discontinua marca el umbral del ensayo (P/N > 2) con VNOi (A) y rE (B) y la vertical el umbral con rDIII. En cada caso (\*) indica un suero no específico sobre rDIII, dado que su reactividad no fue 2 veces mayor que la obtenida con el control negativo (Ir-Bac).

### 5.11 Conservación de rE

La proteína rE purificada mantenida a 4° C fue funcional durante al menos 6 meses. Para almacenamientos más prolongados la proteína se congeló (-20° C) o liofilizó y conservó a temperatura ambiente. En este último caso, la proteína se dializó antes de ser liofilizada para eliminar el imidazol. La proteína demostró ser funcional al solubilizarla de nuevo en tampón de tapizado (datos no mostrados).

Por otro lado, la capacidad antigénica de rE se mantuvo cuando con ella se tapizaron placas de ELISA que, tras ser bloqueadas, se congelaron durante al menos 6 meses antes de ser utilizadas.

### 5.12 Capacidad inmunogénica y protectora en el modelo murino de los antígenos recombinantes generados

Por su fácil manejo, bajo coste y disponibilidad de reactivos, los ratones son los animales más utilizados en experimentación. Además, la mayoría de cepas de laboratorio son portadoras de una mutación en la ruta de respuesta por interferón que las hace sensibles a la infección con el VNO (Samuel, 2002). Este hecho, unido a que la patogénesis y el curso de la misma se asemejan en algunos aspectos a la infección en humanos, ha hecho que el modelo murino sea ampliamente utilizado en las investigaciones sobre el VNO (Nalca, Fellows y Whitehouse, 2003).

Los animales se inmunizaron por vía intraperitoneal (i.p.) con rE o rDIII a tres dosis distintas (2, 10 ó 30 µg/animal) por tres veces en intervalos de dos semanas. Las inmunizaciones se realizaron con adyuvante de Freund en una relación 1:1 (antígeno-adyuvante). La primera inmunización se hizo con adyuvante de Freund completo y las dos siguientes con adyuvante de Freund incompleto. Los animales en cada uno de los dos grupos control recibieron PBS-adyuvante y PBS solo, respectivamente (Tabla X).

**Tabla X. Grupos de ratonas Swiss inmunizadas y controles sin inmunizar (experimento 1).**

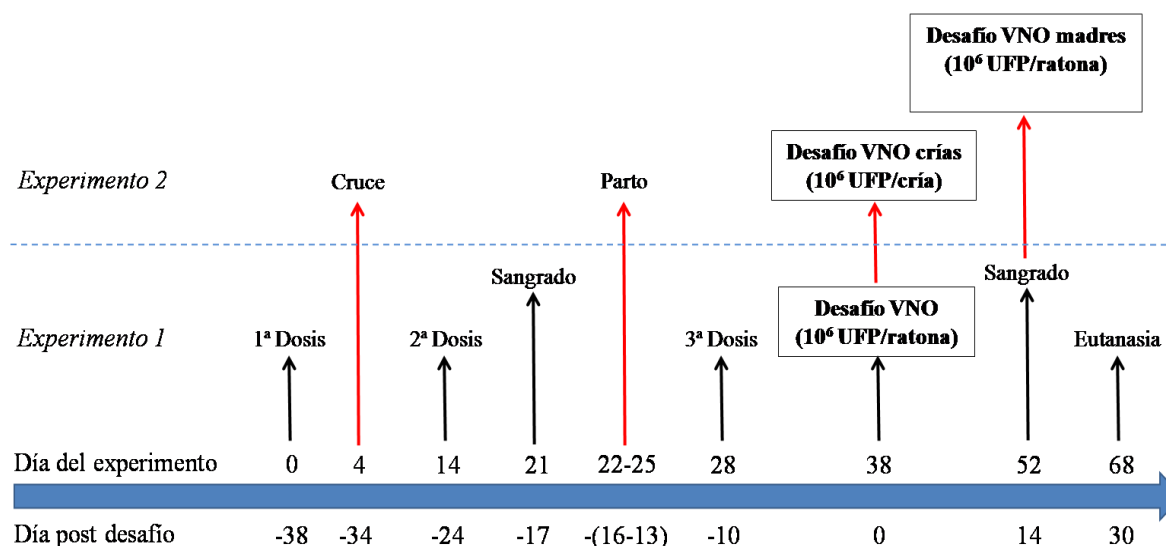
Nº grupo	Nº de animales	Antígeno <sup>a</sup>	Dosis (µg/ratona) <sup>b</sup>
1	7	rE	2
2	6	rE	10
3	7	rE	30
4	6	rDIII	2
5	6	rDIII	10
6	6	rDIII	30
7	6	PBS	-
8	6	PBS sin ady	-

<sup>a</sup> Los antígenos fueron inoculados (100 µl) i.p. tras ser mezclados de forma homogénea (1:1) con adyuvante de Freund, excepto aquellos del grupo 8 que no recibieron adyuvante.

<sup>b</sup> Los animales del grupo 7 recibieron 50 µl de PBS estéril + 50 µl de adyuvante por ratona. Los animales del grupo 8 fueron inoculados con 100 µl de PBS estéril solo por ratona.



A lo largo del experimento se realizaron dos sangrados, antes y después del desafío. Éste se realizó por vía i.p. con  $10^6$  UFP/animal de la cepa neurovirulenta del VNO utilizada a lo largo de la Tesis (Figura 29). La presencia de inmunoglobulinas anti-VNO y su capacidad neutralizante en los sueros se testó mediante ELISA y PRNT, respectivamente. Con las muestras séricas obtenidas pre-desafío se realizó además un ensayo de neutralización *in vivo* en ratones neonatos.

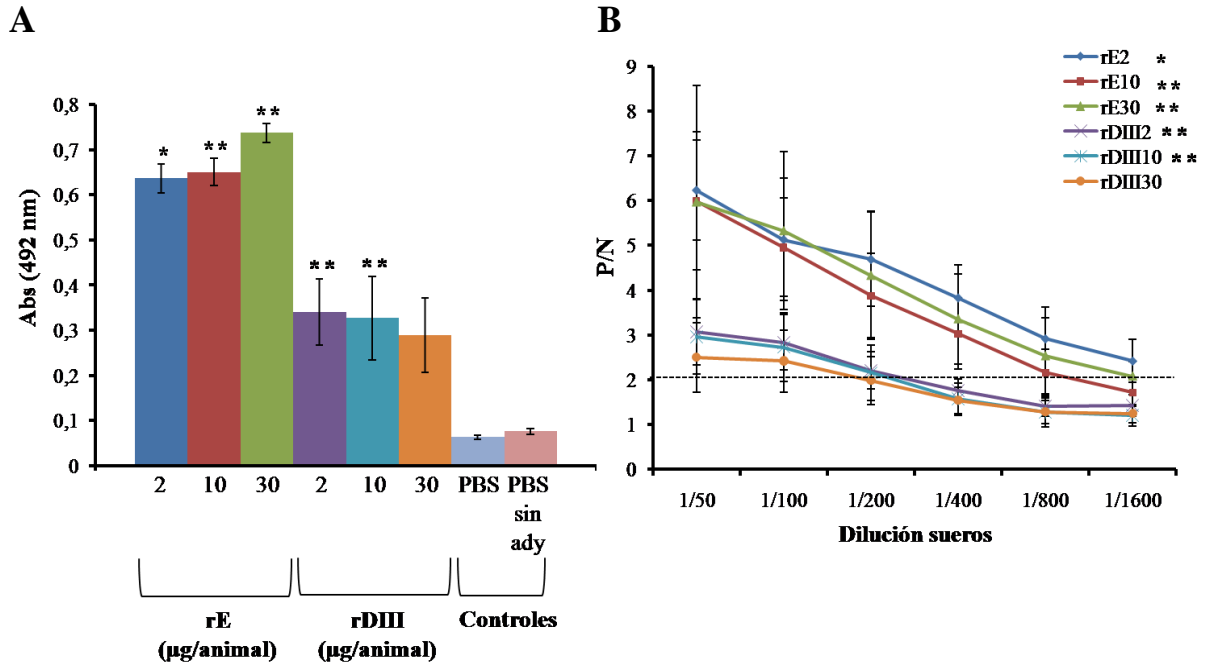


**Figura 29. Desarrollo temporal de eventos de los experimentos con animales.** Experimento 1 (protección); experimento 2 (transmisión vertical de la inmunidad adquirida).

### 5.12.1 Detección de IgG anti-VNO mediante ELISA

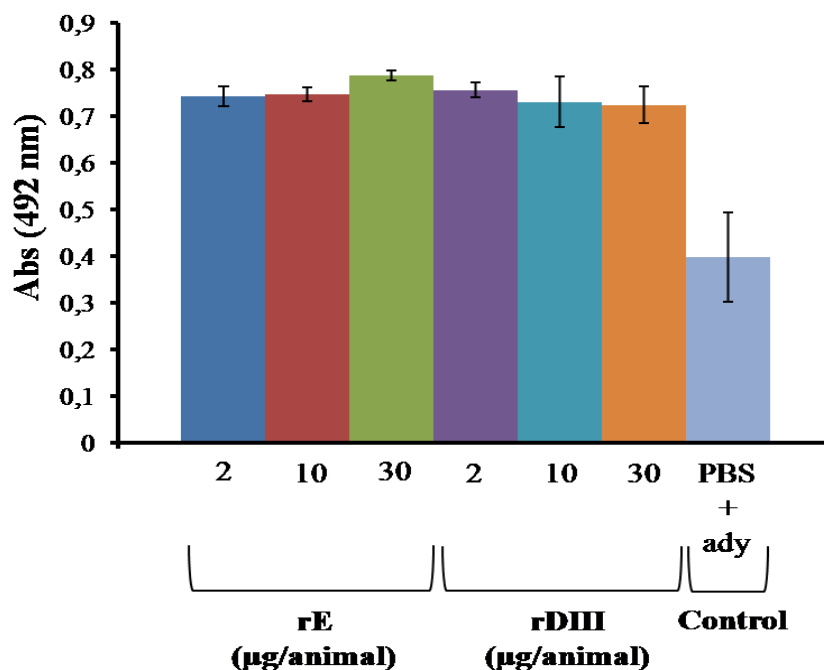
Se utilizó el ELISA basado en rE desarrollado previamente (ver apartado 5.10) para testar las muestras pre- y post-desafío. Los sueros pre-desafío se recolectaron 21 días post 1ª inmunización y 7 días post 2ª inmunización y se incubaron sobre rE diluidos 1/100. La reactividad en ELISA de los sueros de animales inmunizados con rE fue superior a la de aquellos inmunizados con rDIII a cualquiera de las dosis inoculadas (Figura 30A). La reactividad de los sueros de los grupos control fue en todos los casos  $< 0.1$ . Posteriormente, las muestras se titularon de forma individualizada desde la dilución 1/50 hasta la 1/1.600 (Figura 30B). Todos los animales que fueron inmunizados con rE presentaron valores de P/N superiores al valor umbral hasta una dilución 1/800, independientemente de la dosis de antígeno recibida. En cambio, aquellos animales inmunizados con rDIII mostraron unos valores de P/N superiores al valor umbral hasta una dilución 1/200. Para el cálculo de los

valores P/N se consideró el promedio de las reactividades de los sueros de los dos grupos control como valor N.



**Figura 30. (A) Reactividad con rE de los sueros pre-desafío.** Las diferencias con respecto a los animales de los grupos control fueron significativas en todos los grupos inmunizados, excepto rDIII-30 donde sólo se dispuso de 5 de las 6 muestras séricas (\*,  $p \leq 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.002$ ). **(B) Titulación de los sueros pre-desafío.** La línea horizontal discontinua marca el umbral del ensayo ( $P/N > 2$ ). Las diferencias estadísticas entre grupos fueron las mismas que las mencionadas para A.

Los sueros obtenidos 14 días post-desafío se testaron a una dilución 1/100. En todos los animales previamente inmunizados con rE o rDIII se observó un incremento de reactividad con respecto a los datos de ELISA pre-desafío (Figura 31 y Tabla XI). Por otra parte, los animales del grupo control que sobrevivieron al desafío (Tabla X, grupo 7) también presentaron anticuerpos específicos tras la infección.



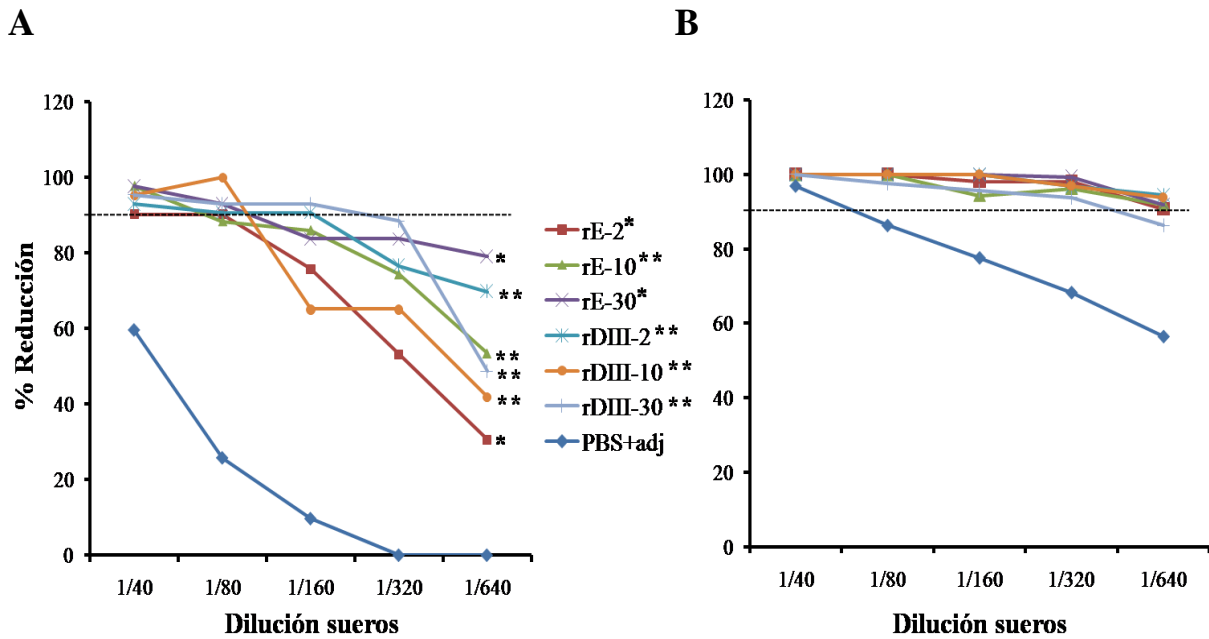
**Figura 31. Reactividad de los sueros post-desafío con rE.** Las diferencias entre los animales de los grupos inmunizados y los del grupo control que sobrevivieron a la infección no fueron estadísticamente significativas.

### 5.12.2 Detección de anticuerpos neutralizantes

En el desarrollo de vacunas frente a flavivirus, la respuesta de anticuerpos neutralizantes es generalmente considerada como el mejor parámetro de eficacia vacunal (Mehlhop y Diamond, 2008). La capacidad neutralizante de los sueros murinos se testó mediante ensayos de neutralización *in vitro* (PRNT), y en el caso de las muestras pre-desafío se realizó también un ensayo de neutralización *in vivo*. Se hicieron mezclas (*pools*) con los sueros de los animales de un mismo grupo y se incubaron con ~ 100 UFP de VNO NY-99 tras lo que se inoculó la mezcla sobre células (*in vitro*) o intracranealmente (i.c.) en ratones neonatos (*in vivo*).

En general, los títulos de PRNT<sub>90</sub> pre-desafío fueron dosis dependientes y los sueros de los animales control no mostraron actividad neutralizante alguna (Figura 32A; Tabla XI). La capacidad neutralizante de los sueros de los animales vacunados tras dos inmunizaciones fue similar independientemente de haber recibido rE o rDIII, a diferencia de lo que sucedía con la reactividad en el ELISA. Respecto a los sueros post-desafío, al igual que sucedía con las reactividades de ELISA, los títulos de PRNT<sub>90</sub> de los sueros obtenidos tras la infección se homogenizaron. En este caso el efecto anamnésico fue más elevado que con los valores de ELISA (Figura 32B), llegando a aumentar cuatro veces los títulos PRNT<sub>90</sub> obtenidos antes del

desafío (Tablas XI y XII). Los sueros de los animales del grupo control supervivientes a la infección mostraron títulos bajos de neutralización.



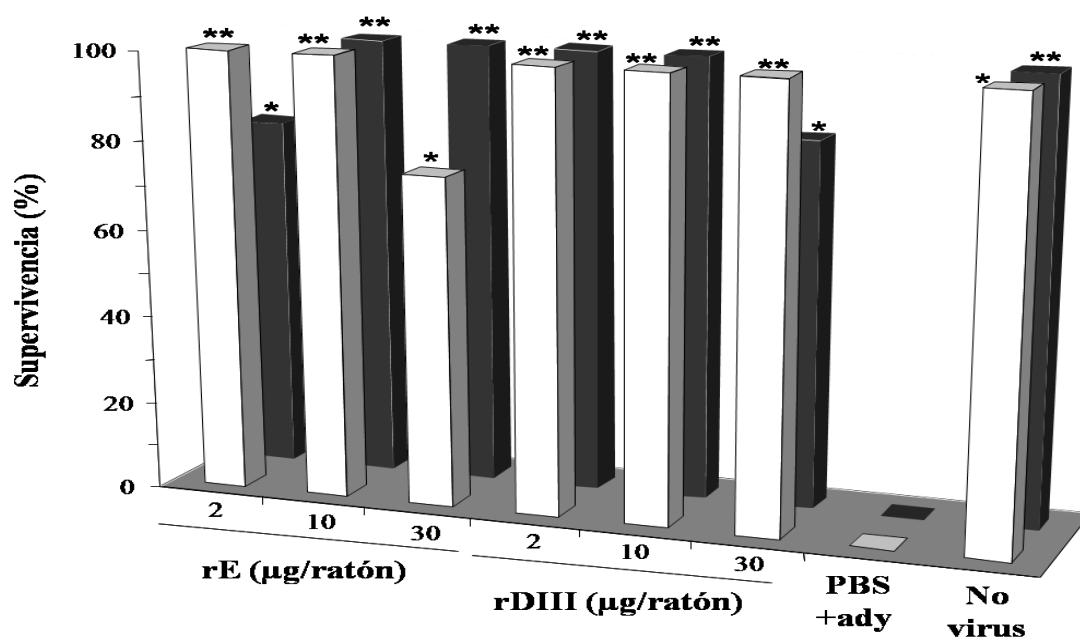
**Figura 32. Títulos de PRNT<sub>90</sub> de los sueros de los animales de los grupos 1 a 7 obtenidos pre- (A) y post-desafío (B).** Las líneas y puntos de colores indican los títulos de PRNT<sub>90</sub> de los *pools* de cada grupo de animales inmunizados y del grupo control inoculado con PBS-adyuvante. La línea horizontal discontinua marca en cada caso el valor umbral del ensayo (reducción  $\geq 90\%$  formación de placas de lisis). Las diferencias entre los animales de los grupos inmunizados y los del grupo control fueron significativas cuando se testaron los sueros pre-desafío (\*,  $p$  valor  $\leq 0.001$ ; \*\*,  $p$  valor  $< 0.002$ ). Estas diferencias dejaron de ser estadísticamente significativas al testar los sueros post-desafío.

**Tabla XI. Media de los títulos de PRNT<sub>90</sub> de los animales de los distintos grupos de animales inmunizados y del grupo control inoculado con PBS-adyuvante, analizados pre- y post-desafío.**

Grupo	Antígeno	Dosis (µg/ratona)	PRNT <sub>90</sub> (Sueros pre-desafío)	PRNT <sub>90</sub> (Sueros post-desafío)
1	rE	2	44.3	697.3
2	rE	10	105.7	631.7
3	rE	30	179.2	771.0
4	rDIII	2	115.6	1021.3
5	rDIII	10	96.6	950.4
6	rDIII	30	174.2	463.0
7	PBS-ady	-	0	58.3

La capacidad protectora de los sueros pre-desafío se confirmó mediante el ensayo de neutralización *in vivo*. Los sueros de ratones inmunes, independientemente de la dosis de antígeno utilizada (Tabla X, grupos 1 a 6), confirieron una protección prácticamente total

frente a la inoculación i.c. de crías neonatas con una dosis de 100 UFP del VNO, que había sido previamente incubada con diluciones (1/1 y 1/100) de los sueros (Figura 33). Sólo el 5.2% (4/78) de las crías neonatas que fueron inoculadas i.c. con las mezclas de sueros inmunes y virus murieron, en contraste con el 100% de mortandad registrado (entre 8 y 13 días post-inoculación) en el grupo de crías que fue inyectada con la mezcla de sueros de animales inmunizados con PBS-adyuvante y virus. No se registró ninguna muerte en el grupo de control de buena práctica que recibió suero murino pre-inmune diluido en PBS estéril sin virus.



**Figura 33. Capacidad protectora de los sueros pre-desafío (grupos 1 a 7) testados en ratones neonatos.** Las columnas blancas representan los sueros incubados 1/1 con el virus (100 UFP), y las columnas negras los sueros incubados 1/100 con el virus (100 UFP). Las diferencias entre los grupos de animales inmunizados y el grupo de buena práctica con respecto del grupo que recibió la mezcla de sueros del grupo control (PBS-ady) y virus (100 UFP) fueron estadísticamente significativas (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$ , respectivamente).

### 5.12.3 Eficacia protectora de las subunidades recombinantes

Los anticuerpos anti-VNO desarrollados por las inmunizaciones con rE o rDIII protegieron a todos los animales vacunados frente al desafío i.p. con  $10^6$  UFP de VNO. La protección conferida fue estéril ya que ninguno presentó signos de infección. En contraste, el 67% (8/12) de los animales control presentaron morbilidad evidente (pelo erizado, pérdida de actividad, posición encorvada) a día 7 post-desafío. Esta morbilidad resultó en porcentajes de mortalidad del 50% (3/6) y 17% (1/6), respectivamente en los grupos control PBS y PBS-adyuvante (Tabla XII).

Tabla XII. Datos de ELISA y PRNT de los sueros pre- y post-desafío por grupos, así como los resultados de morbilidad y mortalidad obtenidos.

Grupo (n° animales)	Antígeno (µg/dosis/ratona)	ELISA IgG anti-VNO (P/N. promedio ± d.e.) <sup>1</sup>		Título PRNT <sub>90</sub> <sup>2</sup>		Morbilidad (%) <sup>4,6</sup>	Mortalidad (%) <sup>5,6</sup>
		Pre-desafío	Post-desafío	Pre-desafío	Post-desafío		
1 (7)	rE (2)	8,25 ± 0,97	10,31 ± 0,29	44,2	697,3	0 (0/7)	0 (0/7)
2 (6)	rE (10)	9,04 ± 0,42	10,37 ± 0,19	105,7	631,7	0 (0/6)	0 (0/6)
3 (7)	rE (30)	10,25 ± 0,29	10,89 ± 0,18	179,2	771,0	0 (0/7)	0 (0/7)
4 (6)	rDIII (2)	8,45 ± 1,25	10,51 ± 0,24	115,6	1021,3	0 (0/6)	0 (0/6)
5 (6)	rDIII (10)	6,10 ± 1,02	10,15 ± 0,85	96,6	950,4	0 (0/6)	0 (0/6)
6 (6)	rDIII (30)	7,22 ± 1,13	10,07 ± 0,59	174,2	463,0	0 (0/6)	0 (0/6)
7 (6)	- <sup>7</sup>	0,88 ± 0,07	5,53 ± 1,33	0	58,3	50 (3/6)	17 (1/6)
8 (6)	- <sup>8</sup>	0,72 ± 0,03	N.T. <sup>3</sup>	0	N.T. <sup>3</sup>	83 (5/6)	50 (3/6)

<sup>1</sup> Datos de ELISA mostrados como valores de P/N ± la desviación estándar (d.e.).

<sup>2</sup> Títulos PRNT<sub>90</sub> expresados como el recíproco de la dilución capaz de neutralizar ≥ 90% la formación de placas de lisis respecto del control positivo del experimento.

<sup>3</sup> N.T., no testado.

<sup>4</sup> Las diferencias entre los grupos inmunizados y los controles fueron significativas ( $p < 0.05$ ;  $X^2$  respecto grupo 8,  $p < 0.005$ ).

<sup>5</sup> Las diferencias entre los grupos inmunizados y el grupo 8 fueron significativas ( $p < 0.05$ ).

<sup>6</sup> Las diferencias estadísticas no fueron significativas entre los grupos 7 y 8.

<sup>7</sup> Los animales del grupo 7 recibieron 50 µl de PBS estéril + 50 µl de adyuvante por ratona.

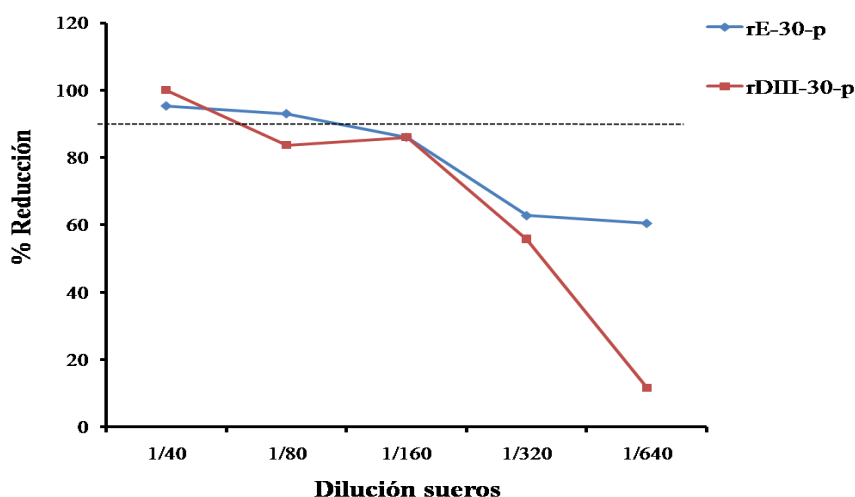
<sup>8</sup> Los animales del grupo 8 fueron inoculados con 100 µl de PBS estéril solo por ratona.

### **5.13 Estudio de las rutas de transmisión de anticuerpos específicos de madres inmunizadas a crías**

Al tiempo que los animales del anterior experimento, y en iguales condiciones de adyuvante y ruta de inoculación, se inmunizaron 4 ratonas Swiss (pelaje blanco) con la dosis más alta (30 µg/animal) de rE (n = 2) y rDIII (n = 2). Entre la 1ª y la 2ª inmunización estas hembras inmunizadas y un grupo de hembras B6D2 (pelaje negro) sin inmunizar se cruzaron con machos fomentando que los partos fueran a producirse lo más sincronizados posibles. La preñez se confirmó por la presencia de tapones vaginales. Los partos se produjeron entre la 2ª y 3ª inmunización en un intervalo de 4 días (Figura 29). En ese momento las crías Swiss y las B6D2 fueron intercambiadas, de forma que cada madre inmunizada criara parte de su progenie original así como parte de crías negras B6D2. De igual forma, cada madre B6D2, no inmunizada, criaría parte de su progenie original y parte de crías Swiss nacidas de madres inmunizadas (dos inmunizaciones durante la gestación; Figura 29). A la vista de los resultados obtenidos, la transmisión pasiva de la inmunidad materna se produjo tanto a través de la placenta durante la gestación (vía transplacentaria), como posteriormente a través de la lactancia. Las crías Swiss criadas por sus madres inmunizadas dispusieron de la oportunidad de inmunizarse a través de ambas rutas.

#### **5.13.1 Inmunización de las madres**

La presencia de anticuerpos anti-VNO neutralizantes en los sueros de las madres inmunizadas recolectados pre-desafío se testó mediante ensayos de neutralización en placa (Figura 34). Los títulos de neutralización (PRNT<sub>90</sub>) que se obtuvieron fueron de 109 y 93, cuando se testaron los sueros de las madres Swiss inmunizadas con rE (30 µg/animal) y rDIII (30 µg/animal), respectivamente. Los títulos de neutralización en placas obtenidos al analizar los sueros de las ratonas del experimento 1 (no cruzadas), inmunizadas con las mismas cantidades de rE ó rDIII, igual número de veces, fueron de 179 y 174, respectivamente (ver Tabla XII).



**Figura 34.** Titulación de anticuerpos neutralizantes (PRNT<sub>90</sub>) de las madres inmunizadas con 30 µg/ratona de rE (línea y rombos azules) o rDIII (línea y cuadrados rojos). La línea horizontal representa el umbral del ensayo (reducción  $\geq$  90% formación de placas de lisis).

### 5.13.2 Efecto protector de rE y rDIII

Las cuatro madres inmunizadas sobrevivieron al desafío i.p. con  $10^6$  UFP/ratona del VNO realizado 24 días después de la última dosis de recuerdo (de 27 a 30 días después del parto y de 5 a 8 días después del destete de sus crías; Figura 29). Las crías fueron desafiadas entre 13 y 16 días post parto. Dos de las cuatro madres no inmunizadas B6D2 murieron, respectivamente, 11 y 13 días después del desafío de las crías tras ingerir crías infectadas. La transmisión del VNO por ingesta en ratones de experimentación ha sido descrita previamente (Blázquez y Saiz, 2010). Las dos madres B6D2 restantes murieron respectivamente 4 y 6 días después de ser desafiadas. En el 75% (3/4) de los cerebros de estos animales se detectó ARN del VNO mediante RT-PCR a tiempo real (ver Tabla XIV).

Todas las crías amamantadas por madres Swiss inmunizadas con rE ( $n = 27$ ) sobrevivieron al desafío (Tabla XIII), ya fuesen crías Swiss propias (que podrían haberse inmunizado por ambas vías: transplacentaria, t.p.; y lactancia, l.) o crías B6D2 “adoptadas” nacidas de madres no inmunizadas (cuya única vía pasiva de transmisión inmune específica fue a través de la lactancia). Igualmente, las crías nacidas de madres inmunizadas con rE pero criadas por madres B6D2 no inmunes ( $n = 13$ ) también registraron un 100% de supervivencia al desafío, mientras que esa tasa fue del 50% respecto a las crías de madres inmunizadas con rDIII y “adoptadas” por madres B6D2. Por lo tanto la inmunidad trans-placentaria conferida por las ratonas Swiss inmunizadas con rE fue más eficiente que la de las inmunizadas con rDIII. Aquellas crías que fueron criadas por las madres rDIII-inmunizadas, propias y



“adoptadas”, mostraron una tasa de supervivencia del 89.5% (17/19) (Tabla XIII). De las crías que recibieron la inmunidad exclusivamente por lactancia sobrevivieron al desafío el 95.8% (23/24). En contraste con estos datos, sólo el 9.1% (2/22) de las crías B6D2 criadas por madres B6D2 no inmunizadas sobrevivieron al desafío, muriendo entre 4 y 7 días después de éste. El ARN viral se detectó mediante RT-PCR a tiempo real en los cerebros del 81.8% (18/22) de estas crías y en el 75% (3/4) de los de las madres no inmunizadas (Tabla XIV).

**Tabla XIII. Tasas de supervivencia de las crías inmunizadas verticalmente.** Se muestran las vías de transmisión posibles: trans-placentaria (crías Swiss criadas por madres B6D2-no inmunes), por lactancia (crías B6D2 criadas por madres Swiss-inmunizadas), y ambas, transplacentaria y lactancia (crías Swiss criadas por madres Swiss-inmunes); así como el porcentaje de supervivencia de las crías sin inmunizar (crías B6D2 criadas por madres B6D2-no inmunes).

Madres	Ruta de transmisión	% de supervivencia (n° de ratones/total)	
		rE	rDIII
No vacunadas	Ninguna	9% (2/22)	
		<b>Inmunógeno</b>	
		<b>rE</b>	<b>rDIII</b>
Vacunadas	Transplacentaria	100% (13/13)	50% (4/8)
	Lactancia	100% (12/12)	91.7% (11/12)
	Transplacentaria y lactancia	100% (15/15)	85.7% (6/7)*

\*Muerte producida 19 días post-desafío probablemente por razones distintas a la infección con el virus; de hecho, no se detectó VNO en su cerebro (ver Tabla XIV).

Tabla XIV. Detección de ARN viral en el cerebro de las madres y crías de las camadas que perdieron animales tras el desafío.

	Muestra	C <sub>T</sub> <sup>1</sup>	rtRT-PCR <sup>2</sup>	Resultado <sup>3</sup>
Madre	B6D2-rE-1	<b>26,01</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
Crías B6D2	1	>40	neg	M
	2	<b>14,84</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	3	<b>19,12</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	4	N.T. <sup>4</sup>	N.T. <sup>4</sup>	M
	5	<b>18,02</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	6	<b>39,8</b>	neg	<b>S</b>
Madre	B6D2-rE-2*	<b>17,61</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
Crías B6D2	1	<b>35,72</b>	neg	M
	2	<b>15,92</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	3	<b>22,95</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	4	<b>19,18</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	5	<b>26,66</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	6	<b>22,48</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
Madre	B6D2-rDIII-1*	<b>18,98</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
Crías Swiss	1	<b>23,53</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	2	<b>27,61</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	3	<b>29,51</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	4	<b>35,74</b>	neg	<b>S</b>
	5	<b>31,74</b>	neg	<b>S</b>
Crías B6D2	1	<b>15,39</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	2	<b>10,28</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	3	<b>14,66</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	4	<b>11,76</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	5	<b>17,56</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	6	<b>37,54</b>	neg	<b>S</b>
Madre	B6D2-rDIII-2	<b>39,97</b>	neg	<b>M</b>
Cría Swiss	1	<b>31,35</b>	<b>d</b>	<b>M</b>
	2	>40	neg	<b>S</b>
	3	>40	neg	<b>S</b>
Crías B6D2	1	<b>28,23</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	2	<b>26,95</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	3	<b>23,62</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
	4	<b>13,22</b>	<b>pos</b>	<b>M</b>
Madre	Swiss-rDIII-2	>40	neg	<b>S</b>
Cría Swiss	1**	<b>30,76</b>	<b>d</b>	<b>M</b>

Datos obtenidos mediante RT-PCR a tiempo real. Los valores C<sub>T</sub> de los controles negativos de extracción fueron en todos los casos  $\geq 35$ . Valores  $30 \leq C_T \leq 35$  fueron considerados dudosos (resaltados en azul); valores  $C_T < 30$  fueron considerados positivos (en rojo). <sup>1</sup> C<sub>T</sub> (*cycle threshold*), ciclo de amplificación a partir del cual se produce un incremento significativo de la fluorescencia respecto de la señal de fondo. <sup>2</sup> RT-PCR a tiempo real: pos, positivo; neg, negativo; d, dudoso. <sup>3</sup> Resultado tras el desafío: M, muerte; S, superviviente. <sup>4</sup> N.T., no testado. \* Madres B6D2 que murieron tras ingerir crías infectadas. \*\* Cría Swiss que murió 19 días post-desafío.





## **Discusión**



## 6. Discusión

### 6.1 Caracterización de una colección de sueros equinos de México

#### 6.1.1 La reactividad cruzada de flavivirus: hándicap en el diagnóstico serológico

El ensayo habitual y más cómodo en términos de tiempo y costes para el diagnóstico serológico del VNO es el ELISA (ver apartado 2.7.2), el cual se basa en la detección de inmunoglobulinas (principalmente IgM e IgG) frente a las proteínas estructurales del virus, que son las que concentran la mayor parte de los determinantes antigénicos virales por ser las más expuestas al reconocimiento inmune (Shi y Wong, 2003). Debido a las semejanzas entre las proteínas estructurales de flavivirus (Roehrig, 2003), las pruebas de ELISA no son específicas. Estas semejanzas antigénicas de los flavivirus se deben a que sus ciclos de transmisión precisan de dos hospedadores distintos: vectores artrópodos como transmisores y vertebrados como hospedadores amplificadores (Burke y Monath, 2001), lo que implica que las proteínas estructurales (prM-E) deben servir para entrar en células muy distintas. Las restricciones intrínsecas a sus ciclos de replicación conllevan la búsqueda de soluciones similares y, consecuentemente, el que sus proteínas estructurales se parezcan, de manera que la respuesta inmune humoral generada frente a las mismas es, en algunos casos, similar.

El problema de realizar un diagnóstico serológico específico es especialmente relevante si las muestras proceden de regiones donde circulan diversos flavivirus. Estas regiones se denominan entonces endémicas para flavivirus; término que en Virología no posee el mismo significado que en Ecología, donde hace referencia a la exclusividad de una especie en una región geográfica concreta. Al ser México un país endémico en flavivirus ([www.dgepi.salud.gov.mx](http://www.dgepi.salud.gov.mx)), para determinar la especificidad de las muestras equinas obtenidas en los estados mexicanos de Chiapas y Puebla, estas se analizaron tanto frente al VNO como frente a otros dos flavivirus (VESL y VILH) circulantes en el país y que pertenecen al mismo serocomplejo que el VNO. Para ello se utilizó el ensayo de inhibición de la hemaglutinación, HI (Beaty, Calisher y Shope, 1989), de manera que para definir un suero como VNO-específico el título de HI debió ser al menos cuatro veces mayor frente a éste que respecto a los otros dos virus incluidos en los ensayos. La elección de estos dos flavivirus se debió a que su presencia en México había sido descrita previamente (Goldsmith *et al.*, 1979). De hecho, un estudio anterior había reportado evidencias de infección equina por VESL en Chiapas (Ulloa *et al.*, 2003). Aunque la prueba idónea en el diagnóstico serológico diferencial para flavivirus es la PRNT (Beaty, Calisher y Shope, 1989), la aceptable especificidad del ensayo de HI, su mayor rapidez en la obtención de resultados y

el hecho de que use antígenos inactivados no infecciosos hacen que esta prueba sea una buena alternativa (Dauphin y Zientara, 2007).

### **6.1.2 Seroprevalencia del VNO en México: expansión de la distribución viral**

Las muestras equinas (n = 288) caracterizadas en esta Tesis fueron recolectadas en la primavera de 2006 en los estados de Chiapas y Puebla. Hasta ese momento la presencia del VNO había sido descrita en otras regiones de México pero no en esos estados (Blitvich *et al.*, 2003a; Estrada-Franco *et al.*, 2003; Lorono-Pino *et al.*, 2003). En el momento de la recolección de las muestras los animales no habían mostrado signos neurológicos, no habían realizado viajes de larga distancia, ni habían sido vacunados frente al VNO. Todas las muestras se analizaron en Madrid mediante ELISA y PRNT. Posteriormente, y merced a nuestra colaboración con el grupo de la UTMB (EE.UU.), parte de la colección (n = 138) fue analizada en sus instalaciones frente al VESL, al VILH y al VNO mediante ensayos de HI.

La concordancia entre los resultados de ELISA y PRNT fue buena. Las pocas divergencias observadas podrían deberse a diversas razones. Así, la capacidad neutralizante de 16 muestras que resultaron IgG-negativas podría deberse a la presencia de inmunoglobulinas neutralizantes IgM, no analizadas en el estudio al no haberse detectado en los animales signos neurológicos, ni ninguna otra enfermedad reciente. En cualquier caso, excepto dos, todas estas muestras presentaron títulos PRNT<sub>90</sub> bajos, y cuando parte de ellas (13/16) fue analizada mediante HI, sólo el 38.5% (5/13) resultó ser VNO-específica. Por otro lado, la única muestra definida como IgG-positiva y PRNT-negativa podría reflejar una infección con otro flavivirus distinto del VNO, el VESL o el VILH, circulante en la región y que no fue incluido en el estudio.

Los valores de seroprevalencia frente al VNO detectados fueron relativamente elevados (31.9%). En un estudio previo sobre la presencia del VNO en México se sugería que la alta seroprevalencia detectada en equinos podría deberse a la sintomatología de afección neurológica del grupo de animales analizados (Estrada-Franco *et al.*, 2003). Resultados posteriores de otro estudio epidemiológico realizado en una región distinta del país (Yucatán) definieron una seroprevalencia frente al VNO aún más elevada (>50%) en animales asintomáticos (Farfan-Ale *et al.*, 2006). Los datos presentados en esta Tesis, fruto del análisis serológico de equinos asintomáticos, coinciden con el trabajo anteriormente referido, al mostrar una seroprevalencia elevada frente al VNO en México.

En cualquier caso, las prevalencias observadas en las dos regiones estudiadas fueron distintas, 53.3% en Chiapas y 8% en Puebla. Esta diferencia muy probablemente sea un



reflejo de una menor actividad del VNO en Puebla, donde el virus habría llegado más recientemente. De hecho, la presencia del VNO había sido ya descrita en regiones cercanas a las localizaciones muestreadas en Chiapas (Figura 10) (Estrada-Franco *et al.*, 2003), hacia donde podría haberse expandido con antelación, tal y como se había sugerido en otro trabajo que indicaba una posible introducción del VNO en la región nororiental de ese estado (Ulloa *et al.*, 2003), cerca de las municipalidades analizadas en esta Tesis. Aunque las condiciones climáticas de las localizaciones muestreadas son muy similares, otros factores, como la ecología de los vectores, podrían también jugar un papel importante en las diferencias de seroprevalencia observadas entre ambas regiones. En cualquier caso, los resultados obtenidos demuestran la continua expansión de la distribución del VNO en el país.

### **6.1.3 Elevada prevalencia, baja incidencia: el VNO en México**

Las diferencias clínicas, en número y gravedad de casos, entre EE.UU. y los países centroamericanos y del Caribe son llamativas (Blitvich, 2008). Desde que fue descrita por primera vez su presencia en México hace siete años sólo se han reportado siete casos de encefalitis en humanos ([www.portal.salud.gob.mx](http://www.portal.salud.gob.mx)), con un único caso fatal que ha sido descrito recientemente, siendo el primer caso fatal en toda América Central, el Caribe y América del Sur (Rios-Ibarra *et al.*, 2010). De modo similar, los registros de muertes de aves y/o equinos infectados por el VNO han sido anecdóticos. Entonces, ¿cómo se explica una elevada presencia del virus con una baja incidencia de la enfermedad tanto en humanos, como en équidos y aves?

De acuerdo con Blitvich (2008), es posible que la menor disponibilidad de recursos por parte de los sistemas de salud pública de algunas de estas regiones, donde además se dan otras enfermedades de mayor impacto, haya contribuido a que infecciones por el VNO pasaran desapercibidas. En cualquier caso, no se han producido brotes epidémicos como los ocurridos en EE.UU. (Blitvich, 2008), con miles de afectados y elevadas tasas de mortandad en aves y équidos, que indudablemente no hubieran pasado desapercibidos. Así pues, es más probable que la disparidad observada se deba a la amplia distribución de otros flavivirus relacionados, y potencialmente cros-reactivos con el VNO, en la región (VDEN, VESL, VILH, Bussuquara, Rocio, Cacipacore,...). Siguiendo esta hipótesis, los individuos que hubieran estado previamente en contacto con alguno de estos flavivirus habrían podido adquirir inmunidad de forma natural frente al VNO. De hecho, en un trabajo reciente se sugiere que la limitada incidencia del mismo en el norte de México, una de las rutas de entrada del virus en el país (Deardorff *et al.*, 2006), puede ser debida a la alta prevalencia de

anticuerpos frente al VDEN en la población de la zona (Rodríguez Mde *et al.*, 2010). Sin embargo, los équidos y las aves no son infectados por el VDEN lo que, unido a la baja prevalencia de los otros flavivirus en la región, hace improbable que la inmunidad adquirida frente a ellos contribuya a la resistencia frente al VNO en esta zona geográfica concreta (Blitvich, 2008). Otra posible alternativa sería el hecho de que, aparentemente, los aislados del VNO detectados en Centroamérica tienen una menor virulencia (Beasley *et al.*, 2004a), aunque este es un tema controvertido ya que en la mayoría de éstos las diferencias en sus genomas con respecto a los aislados estadounidenses son mínimas (Deardorff *et al.*, 2006). Con posterioridad a estos trabajos, las investigaciones de Brault *et al.* (2007) definieron un residuo en la proteína NS3 de los aislados norteamericanos (NS3-249Pro) como determinante crítico de virulencia en aves (cuervos americanos) que sería interesante determinar en los aislados mexicanos. A diferencia de cepas no virulentas, ese residuo también se encuentra en los aislados responsables de los brotes de encefalitis en Europa del Este de finales de los '90 (Brault *et al.*, 2007). Sin embargo, un trabajo recientemente publicado con las primeras cepas aisladas en España no ha encontrado relación entre la mutación NS3-249Pro y su virulencia en ratones (Sotelo *et al.*, 2009).

## 6.2 Selección de las secuencias del VNO a expresar

Puesto que uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral era el desarrollo de un sistema diagnóstico tipo ELISA basado en antígenos no infecciosos, se decidió producir la proteína E de la envuelta viral por ser la que contiene la mayoría de los determinantes antigénicos del virus (Roehrig, 2003; Wang *et al.*, 2001a). El VNO es un virus con envuelta lipídica adquirida durante el proceso de salida de la célula infectada. En esta envuelta se embeben, a través de sus regiones hidrofóbicas C-terminales, dos proteínas estructurales sintetizadas por el virus: la prM y la E (Brinton, 2002). Las regiones hidrofílicas de ambas se sitúan hacia el exterior de la partícula viral y es a través de éstas que el virus interacciona con los receptores celulares, tanto para su adsorción a la membrana plasmática celular como, una vez dentro de la célula, para fusionar su membrana de la envuelta con las membranas endosomales celulares, y así verter la nucleocápsida al citoplasma (Burke y Monath, 2001). Por tanto, la prM y la E son las proteínas virales más expuestas contra las que el sistema inmune del huésped desarrolla el mayor número de anticuerpos. A pesar de que la prM acompaña a la E durante el proceso de maduración de la partícula viral, también se ha descrito que la E puede adquirir su conformación nativa al ser expresada sin su región transmembrana y en ausencia de prM (Ledizet *et al.*, 2005).

Respecto al dominio III, es la región de la proteína E involucrada en la interacción directa entre la partícula viral y su supuesto receptor celular (Chu *et al.*, 2005) y en él se localizan los epítomos neutralizantes más potentes (Mehlhop y Diamond, 2008), lo que le convierte en un buen candidato vacunal (Chu, Chiang y Ng, 2007). Además, se trata de la región de la E que presenta mayores diferencias de secuencia entre flavivirus, por lo que podría ser utilizado para generar sistemas de detección serológica específicos (Beasley *et al.*, 2004b; Holbrook, Shope y Barrett, 2004).

### **6.3 Producción proteica en el sistema de baculovirus**

El sistema de expresión heteróloga basado en baculovirus está en uso desde hace más de veinticinco años y ha sido utilizado para la producción de múltiples moléculas de variado origen y aplicación (Kost, Condreay y Jarvis, 2005). Su mayor ventaja con respecto a otros sistemas de expresión eucariotas es el elevado rendimiento obtenido (Condreay y Kost, 2007). Respecto a los también muy productivos sistemas de expresión procariotas, la principal ventaja del sistema de expresión baculoviral consiste en ser capaz de realizar modificaciones post-traducción de los productos expresados.

La expresión de proteínas recombinantes del VNO ha sido descrita previamente en bacterias (Beasley *et al.*, 2004b; Wang *et al.*, 2001b; Wang *et al.*, 2002), células de mamífero (Davis *et al.*, 2001; Muerhoff *et al.*, 2004), células de *Drosophila* S2 (Ledizet *et al.*, 2005; Lieberman *et al.*, 2007; Muerhoff *et al.*, 2004) y células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes (Qiao *et al.*, 2004). Esta última metodología de expresión permitió determinar la estructura cristalográfica de la proteína E del virus (Nybakken *et al.*, 2006). Sin embargo, la producción de proteínas recombinantes del VNO en larvas de insecto no ha sido descrita con anterioridad al desarrollo de esta Tesis.

Las larvas como plataforma de biosíntesis ofrecen una serie de ventajas frente a las células de insecto que, básicamente, tienen que ver con la manipulación y los costes de producción; de manera que su manejo es más sencillo y se reducen las posibilidades de contaminación, manteniéndose los elevados niveles de producción de proteínas recombinantes. Los costes de producción se reducen con respecto a la expresión en cultivos celulares puesto que el mantenimiento de las larvas no precisa de medios de cultivo caros, ni de equipamientos complejos (van Oers, 2006). Otra ventaja de la expresión en larvas es la facilidad de escalar la producción en caso de precisar grandes cantidades de proteínas recombinantes. De todos modos, estas bio-factorías también presentan inconvenientes,

principalmente el hecho de que la purificación de las proteínas recombinantes es más compleja que cuando se usan sobrenadantes de cultivo de células infectadas.

### **6.3.1 Expresión en células: secreción de los productos recombinantes**

El vector de clonaje utilizado en esta Tesis se basa en el plásmido comercial pFast-Bac-1 de Invitrogen, que fue modificado de manera que bajo control del promotor muy tardío de la polihedrina (que regula la síntesis del producto recombinante insertado) se introdujo la secuencia del péptido señal de la melitina, el componente más abundante del veneno de la abeja europea, *Apis mellífera* (Raghuraman, 2007). La melitina es un péptido de naturaleza anfipática cuya secuencia señal ya ha sido utilizada para mejorar la secreción de proteínas expresadas en células de insecto (Bielefeldt-Ohmann *et al.*, 1997; Sisk *et al.*, 1994; Tessier *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2001). En cambio, en el caso de las dos subunidades proteicas (rE y rDIII) obtenidas en esta Tesis, cuando los cultivos celulares se infectaron con el correspondiente baculovirus recombinante la secreción al medio sobrenadante de las proteínas no fue muy eficiente. Ambas construcciones fueron detectadas mayoritariamente en los sedimentos celulares, indicando que quedaban retenidas en el interior de las células durante el proceso de síntesis. Esto sucedió tanto con la proteína E, a pesar de que se seleccionó sólo su fragmento soluble (E1-452, ~ 50 KDa), como con el dominio III (E297-406, ~ 12 KDa), de menor tamaño y no glicosilado. Dado que no se analizaron las secuencias N-terminales de las proteínas recombinantes obtenidas, no disponemos de datos sobre el posible procesamiento post-traducción de la señal de melitina. En cualquier caso, la retención intracelular de proteínas recombinantes expresadas con el péptido señal de melitina ya ha sido descrita previamente (Johansson *et al.*, 1996; Reavy *et al.*, 2000). Además, la ausencia de secreción podría también deberse a un proceso de agregación intracelular de los productos sintetizados por un exceso de expresión (Bozon *et al.*, 1995).

### **6.3.2 Expresión en larvas de insecto: purificación parcial de las subunidades**

Como se ha comentado anteriormente, una posible desventaja del sistema de expresión en larvas es la recuperación de los productos recombinantes, ya que su extracción se debe realizar mediante homogenización de las larvas, exponiendo al alcance de las proteasas celulares los productos recombinantes. A pesar de esto, el análisis por *Western blot* de las construcciones recombinantes obtenidas a partir de extractos crudos de larvas no mostró degradación apreciable de las construcciones recombinantes, puesto que en todos los casos se detectó una banda única del tamaño esperado.

Durante el proceso de purificación de las proteínas recombinantes se observó, especialmente con la rE, que una parte importante de ésta quedaba retenida junto a membranas y desechos celulares (Figura 18). Este hecho no se observó con el rDIII, cuatro veces más pequeño y no glicosilado, lo que hace suponer que la pérdida de eficacia al solubilizar la rE probablemente se deba al estado de glicosilación de la molécula. En estos momentos se están planificando experimentos específicos para abordar este punto. Los intentos de solubilizar los extractos larvarios con detergentes o la purificación de los sedimentos por las columnas de resina-Ni<sup>2+</sup> no mejoraron el rendimiento. El rendimiento de la purificación del rDIII siempre fue mayor que el de rE.

Tras la purificación parcial de las proteínas, los anticuerpos anti-VNO específicos detectaron dos bandas en la rE, una equivalente a la banda única detectada por el AcM anti-His y la otra, de menor tamaño. Esta segunda banda detectada probablemente sea el resultado de la pérdida de un fragmento del extremo C-terminal de la proteína, que incluye el epítipo de 6 histidinas, durante los procesos de producción y/o purificación de la misma.

#### **6.4 Desarrollo de un sistema ELISA para detectar IgG anti-VNO**

El diagnóstico del VNO se realiza rutinariamente mediante ensayos serológicos (Dauphin y Zientara, 2007), ya que los síntomas clínicos de la enfermedad aparecen cuando la viremia ha pasado y generalmente no es posible la detección molecular del genoma viral (Sanchez-Seco y Navarro, 2005). Como se ha comentado anteriormente, y debido a la reactividad cruzada de los flavivirus, hay que recurrir a otras técnicas diagnósticas para conseguir un resultado específico, generalmente mediante el ensayo de neutralización en placa, PRNT (Beaty, Calisher y Shope, 1989). Esta es una técnica laboriosa que implica el uso de virus infeccioso, con el consiguiente riesgo para el personal que lo maneja. Por su parte, la técnica de ELISA es más sencilla, permite el análisis de un elevado número de muestras en un tiempo reducido y ayuda a excluir las muestras negativas de los ensayos de neutralización confirmatorios. A raíz de la expansión viral en Norteamérica, en los últimos años se han desarrollado varios ELISAs para la detección de inmunoglobulinas anti-VNO en muestras humanas (Lorono-Pino *et al.*, 2009; Malan *et al.*, 2004; Tardei *et al.*, 2000) y animales (Blitvich *et al.*, 2003b; Davis *et al.*, 2001; Ebel *et al.*, 2002).

El antígeno habitual utilizado en las pruebas de ELISA en la mayoría de laboratorios es virus inactivado obtenido a partir de cultivos celulares infectados o cerebros de ratones neonatos inoculados con el virus (Blitvich *et al.*, 2003b; Ebel *et al.*, 2002; Malan *et al.*, 2004; Tardei *et al.*, 2000), al igual que ocurre con los ELISAs comerciales desarrollados, de

los que sólo uno utiliza antígeno recombinante no infeccioso (Hogrefe *et al.*, 2004). Debido a las características zoonóticas de este patógeno, su manipulación debe realizarse en instalaciones con elevados niveles de contención biológica (NSB-3), dado que entraña riesgos inherentes para el personal expuesto al mismo (2002b) y siempre cabe la posibilidad de que se produzcan fugas durante su producción a gran escala. Por todo ello, resulta de gran relevancia disponer de un sistema de diagnóstico basado en antígenos no infecciosos que puedan ser utilizados sin ningún riesgo y de forma cómoda y sencilla. Además, la disponibilidad de antígenos no infecciosos puede dotar a grupos que carecen de las instalaciones para el manejo del virus infectivo de herramientas adecuadas para realizar un primer diagnóstico serológico del VNO de forma rápida, segura y fiable.

#### **6.4.1 Los extractos crudos larvarios como antígenos**

Los extractos crudos de las homogenizaciones de las larvas inoculadas, debido a la cantidad y variedad de proteínas que contienen, presentaron problemas de reactividad inespecífica, especialmente al ser testadas con sueros equinos. Aunque la transcripción de las construcciones recombinantes esté regulada por el promotor muy tardío de la polihedrina baculoviral y la expresión de éstas se vea favorecida (Friesen y Miller, 2001), en las homogenizaciones larvarias las proteínas recombinantes se encuentran diluidas junto a otras proteínas baculovirales y, sobre todo, junto a gran cantidad de proteínas de las larvas. En el caso del extracto rE-L, la inespecificidad se solventó pre-incubando las muestras con antígeno irrelevante (extracto de larvas sin inocular), de forma que el componente inespecífico del extracto quedaba mayoritariamente bloqueado y los sueros reconocían el componente viral cuando se añadían a las placas. Una vez optimizadas las condiciones del ensayo basado en rE-L con una pequeña serie de sueros seleccionados, se comprobó que gran parte del resto de sueros equinos de la colección procedente de México, los cuales habían sido previamente caracterizados como positivos en virtud a su reactividad en ELISA usando virus inactivado como antígeno, resultaron negativos con este sistema, de modo que se desestimó su uso.

Por su parte, los intentos de utilizar el extracto rDIII-L como antígeno nunca dieron resultados aceptables, ya que cuando se incubaron los sueros equinos (previamente caracterizados) sobre este antígeno, en general, no se observaron diferencias de reactividad entre los positivos y los negativos. Tampoco cuando se incubaron sueros murinos, que en todos los casos presentaban menos problemas de reactividad inespecífica.

#### **6.4.2 Las proteínas purificadas rE y rDIII como antígenos: validación de los ELISAs basados en subunidades proteicas recombinantes**

La purificación parcial de las subunidades recombinantes a partir de los extractos larvarios permitió mejorar los sistemas de detección, de forma que el rDIII fue capaz de ser reconocido específicamente por los sueros positivos. Además, la reactividad de los sueros negativos sobre ambos antígenos recombinantes (rE y rDIII) se redujo ostensiblemente, mientras que la reactividad de los sueros positivos se mantuvo. En cualquier caso, la reactividad observada fue siempre mayor sobre la rE que sobre el rDIII, tal y como evidenció la evaluación antigénica de las proteínas recombinantes con una serie de anticuerpos monoclonales y policlonales de reactividad conocida. Salvo en un caso, siempre presentaron una mayor reactividad frente a la proteína E, de mayor tamaño y que alberga un mayor número de epítomos susceptibles de ser reconocidos. El único anticuerpo testado que mostró una reactividad mayor sobre el rDIII fue E24, que es un AcM DIII-específico (Oliphant *et al.*, 2007).

La validez de las proteínas recombinantes purificadas rE y rDIII como antígenos diagnósticos se confirmó por comparación con los resultados obtenidos, utilizando como antígeno el virus inactivado (VNOi), con la colección de sueros equinos de México. Los resultados de los ensayos de ELISA fueron posteriormente confirmados mediante su comparación con los resultados obtenidos con el test serológico de referencia, PRNT (Beaty, Calisher y Shope, 1989). Los valores de concordancia (90%), especificidad (94.4%) y sensibilidad (88.1%) obtenidos con el ELISA basado en la rE con respecto a la prueba de referencia fueron buenos. Entre los 60 sueros analizados, sólo cinco fueron IgG-negativos y PRNT-positivos. Tres de esos cinco sueros resultaron positivos sobre el VNOi, por lo que la capacidad neutralizante de los otros dos pudo deberse a la presencia de otro tipo de inmunoglobulinas anti-VNO (por ejemplo, IgM) no testadas. Las únicas tres muestras divergentes entre el ensayo basado en el VNOi y el basado en la rE, dieron valores de P/N muy cercanos al umbral del ELISA: ligeramente positivos sobre VNOi y ligeramente negativos sobre rE, y además todas presentaron títulos de neutralización bajos ( $PRNT_{90} = 40$ ), justo en el valor umbral del ensayo de neutralización. La única muestra que resultó IgG-positiva y PRNT-negativa, tanto sobre el VNOi como sobre el rE, podría ser a consecuencia de que presentara reactividad cruzada con otro flavivirus presente en la zona en el momento del muestreo.

Por otro lado, la sensibilidad del rDIII (45.2%) fue muy inferior a la mostrada por los otros antígenos (rE o VNOi), ya que apenas reconoció la mitad de las muestras PRNT-

positivas. A diferencia de lo reportado por Beasley *et al.* (2004), al testar especímenes diagnósticos sobre el rDIII, la correlación obtenida con la prueba de referencia PRNT no fue buena (concordancia 62.5%,  $\kappa = 0.33$ ), como tampoco lo fue con respecto a los ensayos basados en la rE (68.3%,  $\kappa = 0.42$ ) o el VNOi (63.3%,  $\kappa = 0.35$ ). En resumen, los resultados obtenidos desestiman la utilización del rDIII como antígeno diagnóstico, lo que tiene sentido si se considera que la caracterización de repertorios naturales de anticuerpos monoclonales anti-VNO humanos (Oliphant *et al.*, 2007; Throsby *et al.*, 2006) y equinos (Sánchez *et al.*, 2007), así como la generación de repertorios de anticuerpos monoclonales murinos (Oliphant *et al.*, 2005) demuestran la inmunodominancia de los dominios I y II de la proteína E. Aunque los anticuerpos más neutralizantes se hayan localizado en epítomos del dominio III (Beasley y Barrett, 2002; Oliphant *et al.*, 2005), esto no significa que sean los más abundantes. De hecho, podría ser una estrategia de “supervivencia viral” al dirigir la respuesta inmune humoral, componente fundamental de la respuesta del hospedador frente a la infección (Diamond *et al.*, 2003a), hacia determinantes antigénicos no neutralizantes o débilmente neutralizantes (Oliphant *et al.*, 2006). En contraste, el ELISA basado en el rE mostró unos parámetros de sensibilidad y especificidad buenos cuando se compararon con los del VNOi y el PRNT, lo que demuestra su utilidad para el análisis de la presencia de anticuerpos anti-VNO en muestras de suero equinas y murinas. Es más, datos recientes obtenidos en el laboratorio han confirmado su utilidad cuando se ha ensayado con muestras séricas de aves infectadas tanto experimentalmente como de forma natural.

La importancia de la vigilancia epidemiológica en muestras aviarias, equinas, y humanas está fuera de duda. Poseer datos fiables y consistentes sobre la incidencia y prospectiva de aparición del virus en una región ayuda de forma indudable a la prevención y preparación de los sistemas de salud ante un posible episodio epidemiológico (Blitvich, 2008). Aunque su impacto en la población haya sido relativamente bajo hasta ahora, la enfermedad causada por el VNO puede ser mortal o dejar secuelas neurológicas severas, especialmente en pacientes inmuno-senescentes (ancianos y personas inmuno-comprometidas) (Sejvar, 2007). Además, tal y como puso de manifiesto su aparición en el continente americano, conlleva una gran alarma social, sin olvidar que, dada la gran plasticidad de los virus ARN, la posibilidad de la aparición de cepas más virulentas y patogénicas siempre está presente. Por todo ello, la vigilancia epidemiológica del virus es importante para detectar brotes epidémicos estacionales y poder desarrollar de manera eficiente las tareas de prevención y control de la enfermedad (Lindsey *et al.*, 2010).



### 6.5 Eficacia protectora de los antígenos recombinantes en el modelo murino

Las vacunas que utilizan subunidades proteicas como inmunógenos se basan en la inoculación de las proteínas virales más inmunogénicas (generalmente las proteínas estructurales), junto a compuestos adyuvantes que colaboran en el desarrollo de respuestas inmunes potentes, cuya especificidad sería aportada por las subunidades inoculadas. La mayoría de los determinantes antigénicos descritos en las proteínas estructurales de los flavivirus están involucrados en el reconocimiento por anticuerpos (respuesta humoral) (Roehrig, 2003). Aunque la inmunidad celular es importante durante la infección por el VNO (Shrestha y Diamond, 2004), la respuesta humoral neutralizante es generalmente considerada como el mejor parámetro para medir la eficacia de los candidatos vacunales.

Las dos desventajas principales que se achacan a la inmunización con subunidades proteicas son: su incapacidad, en ciertas circunstancias, de generar una respuesta inmune eficiente y el requerimiento de inmunizaciones múltiples para mantener los niveles de ésta (Dauphin y Zientara, 2007). La capacidad inmunogénica y protectora de las subunidades proteicas administradas con adyuvantes ha sido demostrada en diversos modelos animales (Bonafé *et al.*, 2009; Lieberman *et al.*, 2007; Lieberman *et al.*, 2009); además, la longevidad de la respuesta neutralizante inducida, considerada el parámetro de eficacia de las vacunas frente al VNO, también ha sido demostrada ya en hámsteres (Watts *et al.*, 2007) y caballos (Ledizet *et al.*, 2005). Así mismo, se ha descrito la existencia de epítomos de células T en el DIII del VEJ, necesarios para asegurar una protección duradera (Verma *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2003). De hecho, actualmente hay un candidato a vacuna anti-VNO humana de este tipo en fase I de ensayos clínicos ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Las subunidades proteicas obtenidas en esta Tesis a partir de larvas inoculadas con baculovirus recombinantes y parcialmente purificadas fueron capaces de originar inmunidad estéril en todos los animales inoculados con las mismas, independientemente de la dosis utilizada (2, 10 ó 30 µg/animal), y originaron una protección eficaz, tal y como demuestran los resultados del ensayo de neutralización *in vivo* con ratones neonatos (apartado 5.12.2). Los niveles de anticuerpos neutralizantes inducidos con sólo dos inoculaciones fueron suficientes para proteger el 95% de éstos de un desafío intracraneal letal con una cepa neurovirulenta del VNO.

A pesar de que los animales inoculados con el rDIII presentaron títulos de ELISA más bajos, no hubo diferencias entre los títulos de neutralización y la capacidad protectora de ambas subunidades. Es más, las ratonas inmunizadas con apenas 2 µg del rDIII/animal presentaron mejor capacidad neutralizante *in vitro* que el grupo de ratonas que recibió la

misma cantidad del rE. Las reactividades más altas en ELISA obtenidas con los sueros de los animales inoculados con el rE eran esperables, al contener ésta un mayor número de epítomos reconocibles y haberse usado el ELISA basado en ella para la detección de IgG anti-VNO.

Los mayores brotes epidémicos del VNO se han producido en EE.UU. (Blitvich, 2008). Sin embargo, tras el pico de infecciones en 2003, el número de casos diagnosticados ha descendido paulatinamente en años posteriores ([www.cdc.gov/westnile](http://www.cdc.gov/westnile)). Considerando la relativa baja incidencia de la enfermedad y los elevados costes de desarrollo, la utilidad (coste-efectividad) de un programa de vacunación generalizado es incierto (Zohrabian, Hayes y Petersen, 2006). Aún así, las autoridades sanitarias no descartan el desarrollo de programas de vacunación, especialmente los dirigidos a los sectores poblacionales que se encuentran en mayor riesgo de padecer los cuadros clínicos más graves de la enfermedad (encefalitis y meningoencefalitis), es decir, ancianos y pacientes inmunodeprimidos. Se trataría pues de desarrollar una vacuna de bajos costes, eficaz y muy segura. Hasta la fecha, se han desarrollado numerosos candidatos vacunales frente a la infección por el VNO basados en diversas estrategias (ver apartado 2.9). Si se tienen en cuenta las características concretas del sector poblacional (inmunológicamente débil) receptor de las posibles vacunas, la seguridad de éstas debe ser máxima y, a su vez y por el mismo motivo, su capacidad inmunogénica elevada. Ambos requisitos son eficientemente alcanzados por una estrategia de inmunización con subunidades adyuvadas, donde la capacidad inmune del hospedador es amplificada y dirigida hacia los epítomos de neutralización viral más potentes. Frente a otros sistemas de producción de proteínas heterólogas (ver apartado 6.3) utilizar larvas como bio-factoría garantizaría unos costes de producción más bajos.

En concordancia con algunos trabajos publicados durante el desarrollo de esta Tesis (Chu, Chiang y Ng, 2007; Martina *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2007), los resultados obtenidos aquí indican que ambas proteínas recombinantes (rE y rDIII) son buenos candidatos vacunales frente al VNO, dado que las dos protegen completamente y por igual frente a la infección con el virus. En relación con otros flavivirus, como por ejemplo el VDENV, se ha descrito que este tipo de inmunizaciones con subunidades podría dar lugar a un proceso de aumento de la infección mediada por anticuerpos (*antibody-dependent enhancement of infection*, ADE) (Thomas *et al.*, 2006). A pesar de que en el caso del VNO este fenómeno sólo ha podido ser demostrado *in vitro* con cantidades sub-neutralizantes de algunos anticuerpos dirigidos frente a los dominios I y II de la proteína E (Klasse y Burton, 2007), su efecto *in vivo* no se puede descartar completamente. La inmunización

convenientemente ayudada con una región tan vulnerable para el virus como el DIII, y que ofrece la seguridad de no conllevar ningún riesgo de ADE, sería por tanto un candidato vacunal muy idóneo (Throsby *et al.*, 2007).

### **6.5.1 Vías de transmisión vertical de la inmunidad: intrauterina y transplacentaria**

La transmisión pasiva de la inmunidad frente al VNO ha sido previamente descrita en aves (Baitechman, Tlusty y Murphy, 2007; Gibbs *et al.*, 2005). En mamíferos, la inmunidad materna, principalmente inmunoglobulinas IgG e IgA, puede ser transferida a las crías a través de la placenta y durante la lactancia (Hasselquist y Nilsson, 2009). En esta Tesis se ha demostrado que la transmisión de la inmunidad adquirida por las ratonas inmunizadas con las proteínas rE o rDIII se produce por ambas rutas, de las cuales, la inmunidad adquirida por lactancia protegió a un porcentaje mayor de crías; si bien hay que tener en cuenta que al producirse los partos entre la segunda y tercera inmunizaciones (Figura 29), los niveles de inmunidad adquiridos por vía transplacentaria se debieron tan sólo a dos inmunizaciones. En contraste, las crías que lactaron de madres inmunizadas pudieron adquirir de forma pasiva una inmunidad inducida por tres inmunizaciones sucesivas. Para que la inmunización materna proteja a las crías, los niveles protectores de IgG específica deben encontrarse en la madre en el momento de la transmisión, dependiendo ésta del periodo de tiempo en el que la inmunización materna es efectiva (Simister, 2003). Si se considera que la respuesta IgG se desarrolla entre 5 y 7 días post-inmunización, las crías que fueron inmunizadas por vía uterina dispusieron de un intervalo de tiempo menor en el que los niveles de IgG anti-VNO en las madres sería máximo (Figura 29) en comparación con el tiempo del que dispusieron las lactantes.

La capacidad neutralizante *in vitro* de los sueros de madres inmunizadas fue menor que la de las ratonas no cruzadas inmunizadas con las mismas cantidades de rE o rDIII, por lo que la gestación podría estar alterando su capacidad de respuesta inmunitaria tal y como ha sido observado previamente (Córdoba *et al.*, 2007). En cualquier caso, todas las madres inmunizadas sobrevivieron al desafío realizado 30 días después del parto, en contraste con el 100% de mortandad observado entre las ratonas cruzadas no inmunizadas (cepa B6D2), desafiadas en el mismo momento. La menor capacidad protectora conferida por las ratonas que fueron inmunizadas con el rDIII podría deberse al menor título de anticuerpos neutralizantes que alcanzaron, y que afectó principalmente a las crías inmunizadas por vía transplacentaria.



## **Conclusiones**



## 7. Conclusiones

1. La infección con el VNO continúa expandiéndose por México, tal y como confirma la detección, por primera vez, de anticuerpos específicos frente al mismo en muestras séricas de caballos procedentes de los estados mexicanos de Chiapas y Puebla, donde la actividad del virus no se había reportado con anterioridad.
2. La proteína de la envuelta (E) del VNO, y el dominio III (DIII) de ésta, se expresan eficazmente en células de insecto *Sf21* y larvas de *Trichoplusia ni* infectadas con los baculovirus recombinantes rBac-Es y rBac-DIII correspondientes, si bien el rDIII lo hace de manera más eficaz y con un mayor rendimiento.
3. Las proteínas recombinantes rE y rDIII son reconocidas por anticuerpos específicos frente al VNO desarrollados por animales infectados tanto de forma experimental como natural, si bien la sensibilidad de rDIII es muy inferior a la de rE, lo que descarta a aquel como posible antígeno de uso diagnóstico.
4. El ELISA basado en el uso de la proteína E recombinante parcialmente purificada como antígeno presenta una muy buena sensibilidad y especificidad, así como una buena concordancia, tanto con el sistema de ELISA basado en el uso de virus inactivado habitualmente utilizado en los laboratorios, como con el sistema de referencia diagnóstica de neutralización mediante reducción de placa de lisis. Por ello, el ELISA optimizado en esta Tesis es una herramienta diagnóstica útil para el escrutinio inicial de sueros sin que se requieran instalaciones de bioseguridad.
5. Las dos proteínas recombinantes obtenidas, rE y DIII, son inmunógenos eficaces que originan títulos elevados de anticuerpos neutralizantes específicos en ratones inmunizados, los cuales resultan protegidos frente al desafío con una dosis letal del VNO, siendo por tanto ambos buenos candidatos vacunales.
6. La inmunidad adquirida por ratonas gestantes inmunizadas con ambas proteínas recombinantes se transmite verticalmente a su descendencia, tanto a través de la placenta como por lactancia, confiriéndole protección frente a la infección con el VNO.





## **Bibliografía**



## 8. Bibliografía

- (2002a). Intrauterine West Nile virus infection--New York, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51, 1135-6.
- (2002b). Laboratory-acquired West Nile virus infections--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51, 1133-5.
- (2002c). Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding--Michigan, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51, 877-8.
- Anderson, J. F., Andreadis, T. G., Vossbrinck, C. R., Tirrell, S., Wakem, E. M., French, R. A., Garmendia, A. E., y van Kruiningen, H. J. (1999). Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut. *Science* 286, 2331-3.
- Anderson, J. F., y Rahal, J. J. (2002). Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerg Infect Dis* 8, 107-8.
- Arjona, A., Ledizet, M., Anthony, K., Bonafe, N., Modis, Y., Town, T., y Fikrig, E. (2007). West Nile virus envelope protein inhibits dsRNA-induced innate immune responses. *J Immunol* 179, 8403-9.
- Arroyo, J., Miller, C. A., Catalan, J., y Monath, T. P. (2001). Yellow fever vector live-virus vaccines: West Nile virus vaccine development. *Trends Mol Med* 7, 350-4.
- Baitchman, E. J., Tlusty, M. F., y Murphy, H. W. (2007). Passive transfer of maternal antibodies to West Nile virus in flamingo chicks (*Phoenicopterus chilensis* and *Phoenicopterus ruber ruber*). *J Zoo Wildl Med* 38, 337-40.
- Bakonyi, T., Hubalek, Z., Rudolf, I., y Nowotny, N. (2005). Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 11, 225-31.
- Bakonyi, T., Ivanics, E., Erdelyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenbock, H., y Nowotny, N. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 12, 618-23.
- Balasuriya, U. B., Shi, P. Y., Wong, S. J., Demarest, V. L., Gardner, I. A., Hullinger, P. J., Ferraro, G. L., Boone, J. D., De Cino, C. L., Glaser, A. L., Renshaw, R. W., Ledizet, M., Koski, R. A., y MacLachlan, N. J. (2006). Detection of antibodies to West Nile virus in equine sera using microsphere immunoassay. *J Vet Diagn Invest* 18, 392-5.
- Banet-Noach, C., Simanov, L., y Malkinson, M. (2003). Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese. *Avian Pathol* 32, 489-94.
- Baqar, S., Hayes, C. G., Murphy, J. R., y Watts, D. M. (1993). Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 48, 757-62.
- Beasley, D. W., y Barrett, A. D. (2002). Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *J Virol* 76, 13097-100.
- Beasley, D. W., Davis, C. T., Estrada-Franco, J., Navarro-Lopez, R., Campomanes-Cortes, A., Tesh, R. B., Weaver, S. C., y Barrett, A. D. (2004a). Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico. *Emerg Infect Dis* 10, 2221-4.
- Beasley, D. W., Holbrook, M. R., Travassos Da Rosa, A. P., Coffey, L., Carrara, A. S., Phillippi-Falkenstein, K., Bohm, R. P., Jr., Ratterree, M. S., Lillibridge, K. M., Ludwig, G. V., Estrada-Franco, J., Weaver, S. C., Tesh, R. B., Shope, R. E., y Barrett, A. D. (2004b). Use of a recombinant envelope protein subunit antigen for specific serological diagnosis of West Nile virus infection. *J Clin Microbiol* 42, 2759-65.
- Beasley, D. W., Whiteman, M. C., Zhang, S., Huang, C. Y., Schneider, B. S., Smith, D. R., Gromowski, G. D., Higgs, S., Kinney, R. M., y Barrett, A. D. (2005). Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. *J Virol* 79, 8339-47.

- Beaty, B. J., Calisher, C. H., y Shope, R. E. (1989). Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. *En "Arboviruses"* (E.H. Lennette, D.A. Lennette y T. Lennette, Eds.). American Public Health Association, Washington D.C.
- Ben-Nathan, D., Gershoni-Yahalom, O., Samina, I., Khinich, Y., Nur, I., Laub, O., Gottreich, A., Simanov, M., Porgador, A., Rager-Zisman, B., y Orr, N. (2009). Using high titer West Nile intravenous immunoglobulin from selected Israeli donors for treatment of West Nile virus infection. *BMC Infect Dis* 9, 18.
- Bendtsen, J. D., Nielsen H., von Heijne, G., y Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides - SignalP 3.0. *J. Mol Biol.*, 783-795.
- Bernabeu-Wittel, M., Ruiz-Perez, M., del Toro, M. D., Aznar, J., Muniain, A., de Ory, F., Domingo, C., y Pachon, J. (2007). West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 25, 561-5.
- Bielefeldt-Ohmann, H., Beasley, D.W.C., Fitzpatrick, D.R., Aaskov, J.G. (1997). Analysis of a recombinant dengue-2 virus-dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system. *Journal of General Virology* 78, 2723-2733.
- Bin, H., Grossman, Z., Pokamunski, S., Malkinson, M., Weiss, L., Duvdevani, P., Banet, C., Weisman, Y., Annis, E., Gandaku, D., Yahalom, V., Hindyieh, M., Shulman, L., Mendelson, E. (2001). West Nile fever in Israel 1999-2000: from geese to humans. *Ann NY Acad Sci*, 127-142.
- Blackwell, J. L., y Brinton, M. A. (1995). BHK cell proteins that bind to the 3' stem-loop structure of the West Nile virus genome RNA. *J Virol* 69, 5650-8.
- Blázquez, A. B., y Sáiz, J.C. (2010). West Nile virus (WNV) transmission routes in the murine model: intrauterine, by breastfeeding and after cannibal ingestion. *Virus Res.* 151, 240-3.
- Blitvich, B. J. (2008). Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim Health Res Rev* 9, 71-86.
- Blitvich, B. J., Fernandez-Salas, I., Contreras-Cordero, J. F., Marlenee, N. L., Gonzalez-Rojas, J. I., Komar, N., Gubler, D. J., Calisher, C. H., y Beaty, B. J. (2003a). Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 9, 853-6.
- Blitvich, B. J., Marlenee, N. L., Hall, R. A., Calisher, C. H., Bowen, R. A., Roehrig, J. T., Komar, N., Langevin, S. A., y Beaty, B. J. (2003b). Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to west nile virus in multiple avian species. *J Clin Microbiol* 41, 1041-7.
- Bofill, D., Domingo, C., Cardenosa, N., Zaragoza, J., de Ory, F., Minguell, S., Sanchez-Seco, M. P., Dominguez, A., y Tenorio, A. (2006). Human West Nile virus infection, Catalonia, Spain. *Emerg Infect Dis* 12, 1163-4.
- Bonafe, N., Rininger, J. A., Chubet, R. G., Foellmer, H. G., Fader, S., Anderson, J. F., Bushmich, S. L., Anthony, K., Ledizet, M., Fikrig, E., Koski, R. A., y Kaplan, P. (2009). A recombinant West Nile virus envelope protein vaccine candidate produced in *Spodoptera frugiperda* expresSF+ cells. *Vaccine* 27, 213-22.
- Bondre, V. P., Jadi, R. S., Mishra, A. C., Yergolkar, P. N., y Arankalle, V. A. (2007). West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol* 88, 875-84.
- Borowski, P., Niebuhr, A., Mueller, O., Bretner, M., Felczak, K., Kulikowski, T., y Schmitz, H. (2001). Purification and characterization of West Nile virus nucleoside triphosphatase (NTPase)/helicase: evidence for dissociation of the NTPase and helicase activities of the enzyme. *J Virol* 75, 3220-9.
- Bosch, I., Herrera, F., Navarro, J. C., Lentino, M., Dupuis, A., Maffei, J., Jones, M., Fernandez, E., Perez, N., Perez-Eman, J., Guimaraes, A. E., Barrera, R., Valero, N.,

- Ruiz, J., Velasquez, G., Martinez, J., Comach, G., Komar, N., Spielman, A., y Kramer, L. (2007). West Nile virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis* 13, 651-3.
- Bozon, V., Remy, J. J., Pajot-Augy, E., Couture, L., Biache, G., Severini, M., Salesse, R. (1995). Influence of promoter and signal peptide on the expression and secretion of recombinant porcine LH extracellular domain in baculovirus/lepidopteran cells or the caterpillar system. *Journal of Molecular Endocrinology* 14, 277-284.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brault, A. C., Huang, C. Y., Langevin, S. A., Kinney, R. M., Bowen, R. A., Ramey, W. N., Panella, N. A., Holmes, E. C., Powers, A. M., y Miller, B.R. (2007). A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet* 39, 1162-6.
- Brien, J. D., Uhrlaub, J. L., Hirsch, A., Wiley, C. A., y Nikolich-Zugich, J. (2009). Key role of T cell defects in age-related vulnerability to West Nile virus. *J Exp Med* 206, 2735-45.
- Brinton, M. A. (2002). The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol* 56, 371-402.
- Burke D. S., y Monath T. P. (2001). Flaviviruses. En "Fields Virology" (D. M. Knipe y P. M. Howley, Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Burkhalter, K. L., Lindsay, R., Anderson, R., Dibernardo, A., Fong, W., y Nasci, R. S. (2006). Evaluation of commercial assays for detecting West Nile virus antigen. *J Am Mosq Control Assoc* 22, 64-9.
- Busch, M. P., Kleinman, S. H., Tobler, L. H., Kamel, H. T., Norris, P. J., Walsh, I., Matud, J. L., Prince, H. E., Lanciotti, R. S., Wright, D. J., Linnen, J. M., y Caglioti, S. (2008). Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. *J Infect Dis* 198, 984-93.
- Byrne, S. N., Halliday, G. M., Johnston, L. J., y King, N. J. (2001). Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice. *J Invest Dermatol* 117, 702-9.
- Calistri, P., Giovannini, A., Hubalek, Z., Monaco, F., Savini, G., y Lelli, R. (2010). Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean basin. *Open Virol J.* 4, 29-37.
- Cantile, C., Di Guardo, G., Eleni, C., y Arispici, M. (2000). Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet J* 32, 31-5.
- Castillo-Olivares, J., y Wood, J. (2004). West Nile virus infection of horses. *Vet Res* 35, 467-83.
- Ciota, A. T., Lovelace A. O., Ngo, K. A., Le, A. N., Maffei, J. G., Franke, M. A., Payne, A. F., Jones, S. A., Kauffman, E. B., y Kramer, L. D. (2007). Cell-specific adaptation of two flaviviruses following serial passage in mosquito cell culture. *Virology* 357, 165-74.
- Ciota, A. T., Ngo, K. A., Lovelace, A. O., Payne, A. F., Zhou, Y., Shi, P. Y., y Kramer, L. D. (2007). Role of the mutant spectrum in adaptation and replication of West Nile virus. *J Gen Virol* 88, 865-74.
- Clarke, D. H., y Casals, J. (1958). Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 7, 561-73.
- Condreay, J. P., y Kost, T.A. (2007). Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr Drug Targets* 8, 1126-31.
- Córdoba, L., Escribano-Romero, E., Garmendia, A., y Saiz, J. C. (2007). Pregnancy increases the risk of mortality in West Nile virus-infected mice. *J Gen Virol* 88, 476-80.

- Coutant, F., Frenkiel, M.P., Despres, P., Charneau, P. (2008). Protective antiviral immunity conferred by a nonintegrative lentiviral vector-based vaccine. *PLoS One* 3(12):e3975.
- Cutler, S. J., Fooks, A. R., y van der Poel, W. H. (2010). Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg Infect Dis* 16, 1-7.
- Chambers, T. J., Halevy, M., Nestorowicz, A., Rice, C. M., y Lustig, S. (1998). West Nile virus envelope proteins: nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness. *J Gen Virol* 79 ( Pt 10), 2375-80.
- Chang, D. C., Liu, W. J., Anraku, I., Clark, D. C., Pollitt, C. C., Suhrbier, A., Hall, R. A., y Khromykh, A. A. (2008). Single-round infectious particles enhance immunogenicity of a DNA vaccine against West Nile virus. *Nat Biotechnol* 26, 571-7.
- Chappell, K. J., Stoermer, M. J., Fairlie, D. P., y Young, P. R. (2008a). Mutagenesis of the West Nile virus NS2B cofactor domain reveals two regions essential for protease activity. *J Gen Virol* 89, 1010-4.
- Chappell, K. J., Stoermer, M. J., Fairlie, D. P., y Young, P. R. (2008b). West Nile Virus NS2B/NS3 protease as an antiviral target. *Curr Med Chem* 15, 2771-84.
- Chernov, A. V., Shiryaev, S. A., Aleshin, A. E., Ratnikov, B. I., Smith, J. W., Liddington, R. C., y Strongin, A. Y. (2008). The two-component NS2B-NS3 proteinase represses DNA unwinding activity of the West Nile virus NS3 helicase. *J Biol Chem* 283, 17270-8.
- Choi, K. S., Ko, Y. J., Nah, J. J., Kim, Y. J., Kang, S. Y., Yoon, K. J., y Joo, Y. S. (2007). Monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detecting and quantifying West Nile virus-neutralizing antibodies in horse sera. *Clin Vaccine Immunol* 14, 134-8.
- Chu, J. H., Chiang, C. C., y Ng, M. L. (2007). Immunization of flavivirus West Nile recombinant envelope domain III protein induced specific immune response and protection against West Nile virus infection. *J Immunol* 178, 2699-705.
- Chu, J. J., y Ng, M. L. (2004a). Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol* 78, 10543-55.
- Chu, J. J., y Ng, M. L. (2004b). Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. *J Biol Chem* 279, 54533-41.
- Chu, J. J., Rajamanonmani, R., Li, J., Bhuvanathan, R., Lescar, J., y Ng, M. L. (2005). Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein. *J Gen Virol* 86, 405-12.
- Chu, P. W., y Westaway, E. W. (1985). Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology* 140, 68-79.
- Chung, K. M., y Diamond, M. S. (2008). Defining the levels of secreted non-structural protein NS1 after West Nile virus infection in cell culture and mice. *J Med Virol* 80, 547-56.
- Chung, K. M., Liszewski, M. K., Nybakken, G., Davis, A. E., Townsend, R. R., Fremont, D. H., Atkinson, J. P., y Diamond, M. S. (2006). West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19111-6.
- Daffis, S., Samuel, M. A., Suthar, M. S., Gale, M., Jr., y Diamond, M. S. (2008). Toll-like receptor 3 has a protective role against West Nile virus infection. *J Virol* 82, 10349-58.
- Dauphin, G., y Zientara, S. (2007). West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine* 25, 5563-76.
- Davis, B. S., Chang, G.J., Cropp, B., Roehrig, J.T., Martin, D.A., Mitchell, C.J., Bowen, R., Bunning, M.L. (2001). West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol* 75, 4040-7.

- Dawson, J. R., Stone, W. B., Ebel, G. D., Young, D. S., Galinski, D. S., Pensabene, J. P., Franke, M. A., Eidson, M., y Kramer, L. D. (2007). Crow deaths caused by West Nile virus during winter. *Emerg Infect Dis* 13, 1912-4.
- Deardorff, E., Estrada-Franco, J., Brault, A. C., Navarro-Lopez, R., Campomanes-Cortes, A., Paz-Ramirez, P., Solis-Hernandez, M., Ramey, W. N., Davis, C. T., Beasley, D. W., Tesh, R. B., Barrett, A. D., y Weaver, S. C. (2006). Introductions of West Nile virus strains to Mexico. *Emerg Infect Dis* 12, 314-8.
- Despres, P., Combredet, C., Frenkiel, M. P., Lorin, C., Brahic, M., y Tangy, F. (2005). Live measles vaccine expressing the secreted form of the West Nile virus envelope glycoprotein protects against West Nile virus encephalitis. *J Infect Dis* 191, 207-14.
- Diamond, M. S. (2009a). Progress on the development of therapeutics against West Nile virus. *Antiviral Res* 83, 214-27.
- Diamond, M. S. (2009b). Virus and host determinants of West Nile virus pathogenesis. *PLoS Pathog* 5, e1000452.
- Diamond, M. S., y Klein, R. S. (2004). West Nile virus: crossing the blood-brain barrier. *Nat Med* 10, 1294-5.
- Diamond, M. S., Shrestha, B., Marri, A., Mahan, D., y Engle, M. (2003a). B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J Virol* 77, 2578-86.
- Diamond, M. S., Shrestha, B., Mehlhop, E., Sitati, E., y Engle, M. (2003b). Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunol* 16, 259-78.
- Diamond, M. S., Sitati, E. M., Friend, L. D., Higgs, S., Shrestha, B., y Engle, M. (2003c). A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J Exp Med* 198, 1853-62.
- Dokland, T., Walsh, M., Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., Ee, K. H., y Wang, S. (2004). West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation. *Structure* 12, 1157-63.
- Domingo, E., y Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*, 151-78.
- Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J., Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 51-82.
- Dong, H., Zhang, B., y Shi, P. Y. (2008). Terminal structures of West Nile virus genomic RNA and their interactions with viral NS5 protein. *Virology* 381, 123-35.
- Ebel, G. D., Dupuis, A. P., 2nd, Nicholas, D., Young, D., Maffei, J., y Kramer, L. D. (2002). Detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to West Nile virus in birds. *Emerg Infect Dis* 8, 979-82.
- Engle, M. J., y Diamond, M. S. (2003). Antibody prophylaxis and therapy against West Nile virus infection in wild-type and immunodeficient mice. *J Virol* 77, 12941-9.
- Epstein, P. R. (2001). West Nile virus and the climate. *J Urban Health* 78, 367-71.
- Erbel, P., Schiering, N., D'Arcy, A., Renatus, M., Kroemer, M., Lim, S. P., Yin, Z., Keller, T. H., Vasudevan, S. G., y Hommel, U. (2006). Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol* 13, 372-3.
- Erdelyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Szeredi, L., Ratz, F., Skare, J., y Bakonyi, T. (2007). Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7, 181-8.
- Estrada-Franco, J. G., Navarro-Lopez, R., Beasley, D. W., Coffey, L., Carrara, A. S., Travassos da Rosa, A., Clements, T., Wang, E., Ludwig, G. V., Cortes, A. C., Ramirez,

- P. P., Tesh, R. B., Barrett, A. D., y Weaver, S. C. (2003). West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis* 9, 1604-7.
- Farfan-Ale, J. A., Blitvich, B. J., Marlenee, N. L., Lorono-Pino, M. A., Puerto-Manzano, F., Garcia-Rejon, J. E., Rosado-Paredes, E. P., Flores-Flores, L. F., Ortega-Salazar, A., Chavez-Medina, J., Cremieux-Grimaldi, J. C., Correa-Morales, F., Hernandez-Gaona, G., Mendez-Galvan, J. F., y Beaty, B. J. (2006). Antibodies to West Nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 74, 908-14.
- Feki, I., Marrakchi, C., Ben Hmida, M., Belahsen, F., Ben Jemaa, M., Maaloul, I., Kanoun, F., Ben Hamed, S., y Mhiri, C. (2005). Epidemic West Nile virus encephalitis in Tunisia. *Neuroepidemiology* 24, 1-7.
- Figuerola, J., Jimenez-Clavero, M. A., Lopez, G., Rubio, C., Soriguer, R., Gomez-Tejedor, C., y Tenorio, A. (2008). Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain. *Vet Microbiol* 132, 39-46.
- Foral, T. M., French, R. A., Van Kruiningen, H. J., y Garmendia, A. E. (2007). Fluorescent antibody test for rapid detection of West Nile virus antigen in avian tissues. *Avian Dis* 51, 601-5.
- Formosinho, P., y Santos-Silva, M. M. (2006). Experimental infection of *Hyalomma marginatum* ticks with West Nile virus. *Acta Virol* 50, 175-80.
- Fox, J. L., Hazell, S. L., Tobler, L. H., y Busch, M. P. (2006). Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus. *Clin Vaccine Immunol* 13, 33-6.
- Freund, J., Casals, J., y Hosmer, E. P. (1937). Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and parafin oil. *Proc Soc Exp Biol Med* 37, 509-13.
- Friesen, P. D., Miller L. K. (2001). Insect viruses. *En " Fields Virology"* (D. M. Knipe y P. M. Howley, Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Garea González, M. T., Filipe, A. R. (1977). Antibodies to arboviruses in Northwestern Spain. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26, 792-797.
- Gershoni-Yahalom, O., Landes, S., Kleiman-Shoval, S., Ben-Nathan, D., Kam, M., Lachmi, B. E., Khinich, Y., Simanov, M., Samina, I., Eitan, A., Cohen, I. R., Rager-Zisman, B., y Porgador, A. (2010). Chimeric vaccine composed of viral peptide and mammalian heat-shock protein 60 peptide protects against West Nile virus challenge. *Immunology* 130, 527-35.
- Gibbs, S. E., Hoffman, D. M., Stark, L. M., Marlenee, N. L., Blitvich, B. J., Beaty, B. J., y Stallknecht, D. E. (2005). Persistence of antibodies to West Nile virus in naturally infected rock pigeons (*Columba livia*). *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 665-7.
- Gilfoy, F., Fayzulín, R., y Mason, P. W. (2009). West Nile virus genome amplification requires the functional activities of the proteasome. *Virology* 385, 74-84.
- Girard, Y. A., Popov, V., Wen, J., Han, V., y Higgs, S. (2005). Ultrastructural study of West Nile virus pathogenesis in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 42, 429-44.
- Girard, Y. A., Schneider, B. S., McGee, C. E., Wen, J., Han, V. C., Popov, V., Mason, P. W., y Higgs, S. (2007). Salivary gland morphology and virus transmission during long-term cytopathologic West Nile virus infection in *Culex* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 76, 118-28.
- Goddard, L. B., Roth, A. E., Reisen, W. K., y Scott, T. W. (2002). Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 8, 1385-91.
- Goldsmith, R. S., Zarate, M.L., Cedeño-Ferreira, J., Antonio Paz, E. (1979). Seroepidemiologic studies in Oaxaca, Mexico. II. Survey for abrovirus antibody. *Arch Invest Med (Mex)* 10, 239-59.



- Gould E. A., y Higgs, S. (2009). Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103, 109-121.
- Guillon, J. C., Oudar, J., Joubert, L., y Hannoun, C. (1968). [Histological lesions of the nervous system in West Nile virus infection in horses]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 114, 539-50.
- Haley, M., Retter, A. S., Fowler, D., Gea-Banacloche, J., y O'Grady, N. P. (2003). The role for intravenous immunoglobulin in the treatment of West Nile virus encephalitis. *Clin Infect Dis* 37, e88-90.
- Hall, R. A., y Khromykh, A. A. (2007). ChimeriVax-West Nile vaccine. *Curr Opin Mol Ther* 9, 498-504.
- Hall, R. A., Nisbet, D. J., Pham, K. B., Pyke, A. T., Smith, G. A., y Khromykh, A. A. (2003). DNA vaccine coding for the full-length infectious Kunjin virus RNA protects mice against the New York strain of West Nile virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10460-4.
- Hall, R. A., Scherret, J. H., y Mackenzie, J. S. (2001). Kunjin virus: an Australian variant of West Nile? *Ann N Y Acad Sci* 951, 153-60.
- Hanna, S. L., Pierson, T. C., Sanchez, M. D., Ahmed, A. A., Murtadha, M. M., y Doms, R. W. (2005). N-linked glycosylation of west nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity. *J Virol* 79, 13262-74.
- Hasselquist, D., y Nilsson, J. A. (2009). Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 51-60.
- Hayes, E. B., Sejvar, J. J., Zaki, S. R., Lanciotti, R. S., Bode, A. V., y Campbell, G. L. (2005). Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 11, 1174-9.
- Heinz, F. X., Auer, G., Stiasny, K., Holzmann, H., Mandl, C., Guirakhoo, F., y Kunz, C. (1994a). The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. *Arch Virol Suppl*, 339-48.
- Heinz, F. X., Stiasny, K., Püschner-Auer, G., Holzmann, H., Allison, S. L., Mandl, C. W., y Kunz, C. (1994b). Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* 198, 109-17.
- Herrmann, S., Leshem, B., Landes, S., Rager-Zisman, B., y Marks, R. S. (2005). Chemiluminescent optical fiber immunosensor for the detection of anti-West Nile virus IgG. *Talanta* 66, 6-14.
- Higgs, S., Schneider, B. S., Vanlandingham, D. L., Klingler, K. A., y Gould, E. A. (2005). Nonviremic transmission of West Nile virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8871-4.
- Hogrefe, W. R., Moore, R., Lape-Nixon, M., Wagner, M., y Prince, H. E. (2004). Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus- and other flavivirus-specific antibodies. *J Clin Microbiol* 42, 4641-8.
- Holbrook, M. R., Shope, R. E., y Barrett, A. D. (2004). Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tick-borne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito-borne flaviviruses. *J Clin Microbiol* 42, 4101-10.
- Holmes, D. A., Purdy, D. E., Chao, D. Y., Noga, A. J., y Chang, G. J. (2005). Comparative analysis of immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virus-like particles or virus-infected mouse brain antigens to detect IgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. *J Clin Microbiol* 43, 3227-36.
- Hubálek, Z., y Halouzka, J. (1999). West Nile fever, a re-emerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 5, 643-50.

- Hurlbut, H. S., Rizk, F., Taylor, R. M., y Work, T. H. (1956). A study of the ecology of West Nile virus in Egypt *Am J Trop Med Hyg* 5, 579-620.
- Hunt, A. R., Hall, R. A., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Savage, H. M., Panella, N. A., Gottfried, K. L., Burkhalter, K. L., y Roehrig, J. T. (2002). Detection of West Nile virus antigen in mosquitoes and avian tissues by a monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 40, 2023-30.
- Ionescu, R. E., Cosnier, S., Herrmann, S., y Marks, R. S. (2007). Amperometric immunosensor for the detection of anti-West Nile virus IgG. *Anal Chem* 79, 8662-8.
- Iwamoto, M., Jernigan, D. B., Guasch, A., Trepka, M. J., Blackmore, C. G., Hellinger, W. C., Pham, S. M., Zaki, S., Lanciotti, R. S., Lance-Parker, S. E., DiazGranados, C. A., Winquist, A. G., Perlino, C. A., Wiersma, S., Hillyer, K. L., Goodman, J. L., Marfin, A. A., Chamberland, M. E., y Petersen, L. R. (2003). Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 348, 2196-203.
- Jimenez-Clavero, M. A., Sotelo, E., Fernandez-Pinero, J., Llorente, F., Blanco, J. M., Rodriguez-Ramos, J., Perez-Ramirez, E., y Hofle, U. (2008). West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007. *Emerg Infect Dis* 14, 1489-91.
- Johansson, T., Enestam, A., Kronqvist, R., Schmidt, M., Tuominen, N., Weiss, S. A., y Oker-Blom, C. (1996). Synthesis of soluble rubella virus spike proteins in two lepidopteran insect cell lines: large scale production of the E1 protein. *J Biotechnol* 50, 171-180.
- Johnson, A. J., Martin, D. A., Karabatsos, N., y Roehrig, J. T. (2000). Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 38, 1827-31.
- Johnson, D. J., Ostlund, E. N., Pedersen, D. D., y Schmitt, B. J. (2001). Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Emerg Infect Dis* 7, 739-41.
- Kanai, R., Kar, K., Anthony, K., Gould, L. H., Ledizet, M., Fikrig, E., Marasco, W. A., Koski, R. A., y Modis, Y. (2006). Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. *J Virol* 80, 11000-8.
- Kapoor, H., Signs, K., Somsel, P., Downes, F. P., Clark, P. A., y Massey, J. P. (2004). Persistence of West Nile Virus (WNV) IgM antibodies in cerebrospinal fluid from patients with CNS disease. *J Clin Virol* 31, 289-91.
- Kaptoul, D., Viladrich, P. F., Domingo, C., Niubo, J., Martinez-Yelamos, S., De Ory, F., y Tenorio, A. (2007). West Nile virus in Spain: report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis. *Scand J Infect Dis* 39, 70-1.
- Kauffman, E. B., Jones, S. A., Dupuis, A. P., 2nd, Ngo, K. A., Bernard, K. A., y Kramer, L. D. (2003). Virus detection protocols for west nile virus in vertebrate and mosquito specimens. *J Clin Microbiol* 41, 3661-7.
- Kelly, B. J., King, L. A., y Possee, R. D. (2007). Introduction to baculovirus molecular biology. *Methods Mol Biol*, 25-54.
- Kitai, Y., Shoda, M., Kondo, T., y Konishi, E. (2007). Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate west nile virus from Japanese encephalitis virus infections in equine sera. *Clin Vaccine Immunol* 14, 1024-31.
- Klasse, P. J., y Burton, D. R. (2007). Antibodies to West Nile virus: a double-edged sword. *Cell Host Microbe* 1, 87-9.
- Klee, A. L., Maidin, B., Edwin, B., Poshni, I., Mostashari, F., Fine, A., Layton, M., y Nash, D. (2004). Long-term prognosis for clinical West Nile virus infection. *Emerg Infect Dis* 10, 1405-11.
- Kleinman, S., Glynn, S. A., Busch, M., Todd, D., Powell, L., Pietrelli, L., Nemo, G., Schreiber, G., Bianco, C., y Katz, L. (2005). The 2003 West Nile virus United States epidemic: the America's Blood Centers experience. *Transfusion* 45, 469-79.

- Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Marder, B. A., Levi, M. E., Laird, S. P., McNutt, J. T., Escott, E. J., Everson, G. T., y Tyler, K. L. (2004). Naturally acquired West Nile virus encephalomyelitis in transplant recipients: clinical, laboratory, diagnostic, and neuropathological features. *Arch Neurol* 61, 1210-20.
- Klenk, K., Snow, J., Morgan, K., Bowen, R., Stephens, M., Foster, F., Gordy, P., Beckett, S., Komar, N., Gubler, D., y Bunning, M. (2004). Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis* 10, 2150-5.
- Komar, N. (2003). West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res* 61, 185-234.
- Komar, N., Lanciotti, R., Bowen, R., Langevin, S., y Bunning, M. (2002). Detection of West Nile virus in oral and cloacal swabs collected from bird carcasses. *Emerg Infect Dis* 8, 741-2.
- Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R., y Bunning, M. (2003). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 9, 311-22.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., y Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23, 567-75.
- LaDeau, S. L., Kilpatrick, A. M., y Marra, P. P. (2007). West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature* 447, 710-3.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lai, H., Engle M., Fuchs, A., Keller, T., Johnson, S., Gorlatov, S., Diamond, M. S., y Chen, Q. (2010). Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. *PNAS* 107, 2419-24.
- Lanciotti, R. S., Ebel, G. D., Deubel, V., Kerst, A. J., Murri, S., Meyer, R., Bowen, M., McKinney, N., Morrill, W. E., Crabtree, M. B., Kramer, L. D., y Roehrig, J. T. (2002). Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology* 298, 96-105.
- Lanciotti, R. S., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Mitchell, C. J., Savage, H. M., Komar, N., Panella, N. A., Allen, B. C., Volpe, K. E., Davis, B. S., y Roehrig, J. T. (2000). Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 38, 4066-71.
- Lanciotti, R. S., Roehrig, J. T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, B., Volpe, K. E., Crabtree, M. B., Scherret, J. H., Hall, R. A., MacKenzie, J. S., Cropp, C. B., Panigrahy, B., Ostlund, E., Schmitt, B., Malkinson, M., Banet, C., Weissman, J., Komar, N., Savage, H. M., Stone, W., McNamara, T., y Gubler, D. J. (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286, 2333-7.
- Lanteri, M. C., Heitman, J. W., Owen, R. E., Busch, T., Gefter, N., Kiely, N., Kamel, H. T., Tobler, L. H., Busch, M. P., y Norris, P. J. (2008). Comprehensive analysis of west nile virus-specific T cell responses in humans. *J Infect Dis* 197, 1296-306.
- Laurent-Rolle, M., Boer E. F., Lubick, K. J., Wolfinbarger, J. B., Carmody, A. B., Rockx, B., Liu, W., Ashour, J., Shupert, W. L., Holbrook, M. R., Barrett, A. D., Mason, P. W., Bloom, M. E., García-Sastre, A., Khromykh, A. A., y Best, S. M. (2010). The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J Virol* 84, 3503-3515.
- Lawrie, C. H., Uzcategui, N. Y., Gould, E. A., y Nuttall, P. A. (2004). Ixodid and argasid tick species and west nile virus. *Emerg Infect Dis* 10, 653-7.

- Ledizet, M., Kar, K., Foellmer, H. G., Wang, T., Bushmich, S. L., Anderson, J. F., Fikrig, E., y Koski, R. A. (2005). A recombinant envelope protein vaccine against West Nile virus. *Vaccine* 23, 3915-24.
- Leung, J. Y., Pijlman G. P., Kondratieva N., Hyde J., Mackenzie J. M., Khromykh A. A. (2008). Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol* 82, 4731-41.
- Levett, P. N., Sonnenberg, K., Sidaway, F., Shead, S., Niedrig, M., Steinhagen, K., Horsman, G. B., y Drebot, M. A. (2005). Use of immunoglobulin G avidity assays for differentiation of primary from previous infections with West Nile virus. *J Clin Microbiol* 43, 5873-5.
- Li, X. F., Jiang, T., Yu, X. D., Deng, Y. Q., Zhao, H., Zhu, Q. Y., Qin, E. D., y Qin, C. F. (2009). RNA elements within the 5' UTR of West Nile virus genome are critical for RNA synthesis and viral replication. *J Gen Virol*.
- Licon Luna, R. M., Lee E., Müllbacher, A., Blanden, R. V., Langman, R., y Lobigs, M. (2002). Lack of both Fas ligand and perforin protects from flavivirus-mediated encephalitis in mice. *J Virol* 76, 3202-11.
- Lieberman, M. M., Clements, D. E., Ogata, S., Wang, G., Corpuz, G., Wong, T., Martyak, T., Gilson, L., Coller, B. A., Leung, J., Watts, D. M., Tesh, R. B., Siirin, M., Travassos da Rosa, A., Humphreys, T., y Weeks-Levy, C. (2007). Preparation and immunogenic properties of a recombinant West Nile virus subunit vaccine. *Vaccine* 25, 414-423.
- Lieberman, M. M., Nerurkar, V. R., Luo, H., Cropp, B., Carrion, R., Jr., de la Garza, M., Coller, B. A., Clements, D., Ogata, S., Wong, T., Martyak, T., y Weeks-Levy, C. (2009). Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant subunit West Nile virus vaccine in rhesus monkeys. *Clin Vaccine Immunol* 16, 1332-7.
- Lim, C. K., Takasaki, T., Kotaki, A., y Kurane, I. (2008). Vero cell-derived inactivated West Nile (WN) vaccine induces protective immunity against lethal WN virus infection in mice and shows a facilitated neutralizing antibody response in mice previously immunized with Japanese encephalitis vaccine. *Virology* 374, 60-70.
- Lim, J. K., Lisco, A., McDermott, D. H., Huynh, L., Ward, J. M., Johnson, B., Johnson, H., Pape, J., Foster, G. A., Kryzstof, D., Follmann, D., Stramer, S. L., Margolis, L. B., y Murphy, P. M. (2009). Genetic variation in OAS1 is a risk factor for initial infection with West Nile virus in man. *PLoS Pathog* 5, e1000321.
- Lim, J. K., McDermott, D. H., Lisco, A., Foster, G. A., Kryzstof, D., Follmann, D., Stramer, S. L., y Murphy, P. M. (2010). CCR5 deficiency is a risk factor for early clinical manifestations of West Nile virus infection but not for viral transmission. *Journal of Infectious Diseases* 201, 178-85.
- Lindenbach, B. D., y Rice, C. (2001). Flaviviridae: the viruses and their replication. *En "Fields Virology"* (D. M. Knipe y P. M. Howley, Eds.). Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Lindsey, N. P., Staples, J. E., Lehman, J. A., y Fischer, M.; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010). Surveillance for human West Nile virus disease- United States, 1999-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 59, 1-17.
- Liu, W. J., Wang, X. J., Clark, D. C., Lobigs, M., Hall, R. A., y Khromykh, A. A. (2006). A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol* 80, 2396-404.
- Lopez, G., Jimenez-Clavero, M. A., Tejedor, C. G., Soriguer, R., y Figuerola, J. (2008). Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8, 615-21.
- Lorono-Pino, M. A., Blitvich, B. J., Farfan-Ale, J. A., Puerto, F. I., Blanco, J. M., Marlenee, N. L., Rosado-Paredes, E. P., Garcia-Rejon, J. E., Gubler, D. J., Calisher, C. H., y

- Beaty, B. J. (2003). Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 9, 857-9.
- Lorono-Pino, M. A., Farfan-Ale, J. A., Blitvich, B. J., Beebe, J. L., Jarman, R. G., y Beaty, B. J. (2009). Evaluation of an epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of West Nile virus infections in humans. *Clin Vaccine Immunol* 16, 749-55.
- Lozano, A., y Filipe, A. R. (1998). [Antibodies against the West Nile virus and other arthropod-transmitted viruses in the Ebro Delta region]. *Rev Esp Salud Publica* 72, 245-50.
- Ludwig, A., Bigras-Poulin, M., y Michel, P. (2009). The analysis of crow population dynamics as a surveillance tool. *Transbound Emerg Dis* 56, 337-45.
- Luria, S. E., y Burrows, J. W. (1957). Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J Bacteriol* 74, 461-76.
- Lustig, S., Olshevsky, U., Ben-Nathan, D., Lachmi, B. E., Malkinson, M., Kobiler, D., y Halevy, M. (2000). A live attenuated West Nile virus strain as a potential veterinary vaccine. *Viral Immunol* 13, 401-10.
- Ma, D., Jiang, D., Qing, M., Weidner, J. M., Qu, X., Guo, H., Chang, J., Gu, B., Shi, P. Y., Block, T. M., y Guo, J. T. (2009). Antiviral effect of interferon lambda against West Nile virus. *Antiviral Res* 83, 53-60.
- Macdonald, J., Tonry, J., Hall, R. A., Williams, B., Palacios, G., Ashok, M. S., Jabado, O., Clark, D., Tesh, R. B., Briese, T., y Lipkin, W. I. (2005). NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. *J Virol* 79, 13924-33.
- Malan, A. K., Martins, T. B., Hill, H. R., y Litwin, C. M. (2004). Evaluations of commercial West Nile virus immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme immunoassays show the value of continuous validation. *J Clin Microbiol* 42, 727-33.
- Malan, A. K., Stipanovich, P. J., Martins, T. B., Hill, H. R., y Litwin, C. M. (2003). Detection of IgG and IgM to West Nile virus. Development of an immunofluorescence assay. *Am J Clin Pathol* 119, 508-15.
- Malet, H., Eglhoff, M. P., Selisko, B., Butcher, R. E., Wright, P. J., Roberts, M., Gruez, A., Sulzenbacher, G., Vonnrhein, C., Bricogne, G., Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., Davidson, A. D., y Canard, B. (2007). Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *J Biol Chem* 282, 10678-89.
- Malet, H., Massé, N., Selisko, B., Romette, J. L., Alvarez, K., Guillemot, J. C., Tolou, H., Yap, T. L., Vasudevan, S., Lescar, J., y Canard, B. (2008). The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. *Antiviral Res* 80, 23-35.
- Malkinson, M., y Banet, C. (2002). The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Curr Top Microbiol Immunol* 267, 309-22.
- Martin, D. A., Muth, D. A., Brown, T., Johnson, A. J., Karabatsos, N., y Roehrig, J. T. (2000). Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1823-1826.
- Martin, J. E., Pierson, T. C., Hubka, S., Rucker, S., Gordon, I. J., Enama, M. E., Andrews, C. A., Xu, Q., Davis, B. S., Nason, M., Fay, M., Koup, R. A., Roederer, M., Bailer, R. T., Gomez, P. L., Mascola, J. R., Chang, G. J., Nabel, G. J., y Graham, B. S. (2007). A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase 1 clinical trial. *J Infect Dis* 196, 1732-40.
- Martina, B. E., Koraka, P., y Osterhaus, A. D. (2010). West Nile Virus: is a vaccine needed? *Curr Opin Investig Drugs* 11, 139-46.
- Martina, B. E., Koraka, P., van den Doel, P., van Amerongen, G., Rimmelzwaan, G. F., y Osterhaus, A. D. (2008). Immunization with West Nile virus envelope domain III

- protects mice against lethal infection with homologous and heterologous virus. *Vaccine* 26, 153-7.
- Mashimo, T., Lucas, M., Simon-Chazottes, D., Frenkiel, M. P., Montagutelli, X., Ceccaldi, P. E., Deubel, V., Guenet, J. L., y Despres, P. (2002). A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11311-6.
- Mattar, S., Edwards, E., Laguado, J., Gonzalez, M., Alvarez, J., y Komar, N. (2005). West Nile virus antibodies in Colombian horses. *Emerg Infect Dis* 11, 1497-8.
- McDonald, W. F., Huleatt, J. W., Foellmer, H. G., Hewitt, D., Tang, J., Desai, P., Price, A., Jacobs, A., Takahashi, V. N., Huang, Y., Nakaar, V., Alexopoulou, L., Fikrig, E., y Powell, T. J. (2007). A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *J Infect Dis* 195, 1607-17.
- McElhaney, J. E., y Effros, R. B. (2009). Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? *Curr Opin Immunol* 21, 418-24.
- McGee, C. E., Schneider, B. S., Girard, Y. A., Vanlandingham, D. L., y Higgs, S. (2007). Nonviremic transmission of West Nile virus: evaluation of the effects of space, time, and mosquito species. *Am J Trop Med Hyg* 76, 424-30.
- Medigeschi, G. R., Hirsch, A. J., Streblow, D. N., Nikolich-Zugich, J., y Nelson, J. A. (2008). West Nile virus entry requires cholesterol-rich membrane microdomains and is independent of alphavbeta3 integrin. *J Virol* 82, 5212-9.
- Mehlhop, E., y Diamond, M. S. (2006). Protective immune responses against West Nile virus are primed by distinct complement activation pathways. *J Exp Med* 203, 1371-81.
- Mehlhop, E., y Diamond, M. S. (2008). The molecular basis of antibody protection against West Nile virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 317, 125-53.
- Mertens, E., Kajaste-Rudnitski, A., Torres, S., Funk, A., Frenkiel, M. P., Itean, I., Khromykh, A. A., y Despres, P. (2010). Viral determinants in the NS3 helicase and 2K peptide that promote West Nile virus resistance to antiviral action of 2',5'-oligoadenylate synthetase 1b. *Virology* 399, 176-185.
- Miller, B. R., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Savage, H. M., Lutwama, J. J., Lanciotti, R. S., y Peters, C. J. (2000). First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 62, 240-6.
- Minke, J. M., Siger, L., Karaca, K., Austgen, L., Gordy, P., Bowen, R., Renshaw, R. W., Loosmore, S., Audonnet, J. C., y Nordgren, B. (2004). Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. *Arch Virol Suppl*, 221-30.
- Modis, Y., Ogata S., Clements D., Harrison S. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *PNAS* 100, 6986-6991.
- Monath, T. P., Liu, J., Kanesa-Thasan, N., Myers, G. A., Nichols, R., Deary, A., McCarthy, K., Johnson, C., Ermak, T., Shin, S., Arroyo, J., Guirakhoo, F., Kennedy, J. S., Ennis, F. A., Green, S., y Bedford, P. (2006). A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6694-9.
- Morales-Betoulle, M. E., Morales, H., Blitvich, B. J., Powers, A. M., Davis, E. A., Klein, R., y Cordon-Rosales, C. (2006). West Nile virus in horses, Guatemala. *Emerg Infect Dis* 12, 1038-9.
- Morales, M. A., Barrandeguy, M., Fabbri, C., Garcia, J. B., Vissani, A., Trono, K., Gutierrez, G., Pigretti, S., Menchaca, H., Garrido, N., Taylor, N., Fernandez, F., Levis, S., y Enria, D. (2006). West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis* 12, 1559-61.

- Muerhoff, A. S., Dawson, G. J., Dille, B., Gutierrez, R., Leary, T. P., Gupta, M. C., Kyrk, C. R., Kapoor, H., Clark, P., Schochetman, G., y Desai, S. M. (2004). Enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant envelope protein expressed in COS-1 and *Drosophila* S2 cells for detection of West Nile virus immunoglobulin M in serum or cerebrospinal fluid. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 651-7.
- Mukhopadhyay, S., Kim, B. S., Chipman, P. R., Rossmann, M. G., y Kuhn, R. J. (2003). Structure of West Nile virus. *Science* 302, 248.
- Muñoz-Jordán, J. L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martínez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W. I., García-Sastre, A. (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol* 79, 8004-13.
- Murgue, B., Murri, S., Triki, H., Deubel, V., y Zeller, H. G. (2001). West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci*, 117-26.
- Murgue, B., Zeller, H., y Deubel, V. (2002). The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr Top Microbiol Immunol* 267, 195-221.
- Nalca, A., Fellows, P. F., y Whitehouse, C. A. (2003). Vaccines and animal models for arboviral encephalitides. *Antiviral Res* 60, 153-74.
- Nir, Y., Goldwasser, R., Lasowski, Y., y Margalit, J. (1968). Isolation of West Nile virus strains from mosquitoes in Israel. *Am J Epidemiol* 87, 496-501.
- Nir, Y. D. (1959). Airborne West Nile virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 8, 537-9.
- Nybakken, G. E., Nelson, C. A., Chen, B. R., Diamond, M. S., y Fremont, D. H. (2006). Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein. *J Virol* 80, 11467-74.
- Nybakken, G. E., Oliphant, T., Johnson, S., Burke, S., Diamond, M. S., y Fremont, D. H. (2005). Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature* 437, 764-9.
- Oceguera, L. F., 3rd, Patiris, P. J., Chiles, R. E., Busch, M. P., Tobler, L. H., y Hanson, C. V. (2007). Flavivirus serology by Western blot analysis. *Am J Trop Med Hyg* 77, 159-63.
- Odelola, H. A., y Oduye, O. O. (1977). West Nile virus infection of adult mice by oral route. *Arch Virol* 54, 251-3.
- Oliphant, T., Engle, M., Nybakken, G. E., Doane, C., Johnson, S., Huang, L., Gorlatov, S., Mehlhop, E., Marri, A., Chung, K. M., Ebel, G. D., Kramer, L. D., Fremont, D. H., y Diamond, M. S. (2005). Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat Med* 11, 522-30.
- Oliphant, T., Nybakken, G. E., Austin, S. K., Xu, Q., Bramson, J., Loeb, M., Throsby, M., Fremont, D. H., Pierson, T. C., y Diamond, M. S. (2007). Induction of epitope-specific neutralizing antibodies against West Nile virus. *J Virol* 81, 11828-39.
- Oliphant, T., Nybakken, G. E., Engle, M., Xu, Q., Nelson, C. A., Sukupolvi-Petty, S., Marri, A., Lachmi, B. E., Olshevsky, U., Fremont, D. H., Pierson, T. C., y Diamond, M. S. (2006). Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile Virus envelope protein. *J Virol* 80, 12149-59.
- Ostlund, E. N., Crom, R. L., Pedersen, D. D., Johnson, D. J., Williams, W. O., y Schmitt, B. J. (2001). Equine West Nile encephalitis, United States. *Emer Infect Dis* 7, 665-9.
- Pealer, L. N., Marfin, A. A., Petersen, L. R., Lanciotti, R. S., Page, P. L., Stramer, S. L., Stobierski, M. G., Signs, K., Newman, B., Kapoor, H., Goodman, J. L., y Chamberland, M. E. (2003). Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med* 349, 1236-45.
- Perelygin, A. A., Scherbik, S., Zhulin, I. B., Stockman, B. M., y Brinton, M. A. (2002). Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. *PNAS* 99, 9322-7.
- Pérez-Filgueira, D. M., González-Camacho, F., Gallardo, C., Resino-Talaván, P., Blanco, E., Gómez-Casado, E., Alonso, C., y Escribano, J. M. (2006). Optimization and validation

- of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J Clin Microbiol* 44, 3114-21.
- Platonov, A. E. (2001). West Nile encephalitis in Russia 1999-2001: were we ready? Are we ready? *Ann N Y Acad Sci*, 102-116.
- Pletnev, A. G., Claire, M. S., Elkins, R., Speicher, J., Murphy, B. R., y Chanock, R. M. (2003). Molecularly engineered live-attenuated chimeric West Nile/dengue virus vaccines protect rhesus monkeys from West Nile virus. *Virology* 314, 190-5.
- Pletnev, A. G., Swayne, D. E., Speicher, J., Rummyantsev, A. A., y Murphy, B. R. (2006). Chimeric West Nile/dengue virus vaccine candidate: preclinical evaluation in mice, geese and monkeys for safety and immunogenicity. *Vaccine* 24, 6392-404.
- Puig-Basagoiti, F., Tilgner, M., Bennett, C. J., Zhou, Y., Munoz-Jordan, J. L., Garcia-Sastre, A., Bernard, K. A., y Shi, P. Y. (2007). A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis. *Virology* 361, 229-41.
- Pupo, M., Guzman, M. G., Fernandez, R., Llop, A., Dickinson, F. O., Perez, D., Cruz, R., Gonzalez, T., Estevez, G., Gonzalez, H., Santos, P., Kouri, G., Andonova, M., Lindsay, R., Artsob, H., y Drebot, M. (2006). West Nile Virus infection in humans and horses, Cuba. *Emerg Infect Dis* 12, 1022-4.
- Qiao, M., Ashok, M., Bernard, K. A., Palacios, G., Zhou, Z. H., Lipkin, W. I., y Liang, T. J. (2004). Induction of sterilizing immunity against West Nile Virus (WNV), by immunization with WNV-like particles produced in insect cells. *J Infect Dis* 190, 2104-8.
- Raghuraman, H., Chattopadhyay, A. (2007). Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep* 27, 189-223.
- Rahal, J. J., Anderson, J., Rosenberg, C., Reagan, T., y Thompson, L. L. (2004). Effect of interferon-alpha2b therapy on St. Louis viral meningoencephalitis: clinical and laboratory results of a pilot study. *J Infect Dis*. 190, 1084-7.
- Rahbek, C. (2007). Disease ecology: the silence of the robins. *Nature* 447, 652-3.
- Ramanathan, M. P., Chambers, J. A., Pankhong, P., Chattergoon, M., Attatippaholkun, W., Dang, K., Shah, N., y Weiner, D. B. (2006). Host cell killing by the West Nile Virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. *Virology* 345, 56-72.
- Ray, D., Shah, A., Tilgner, M., Guo, Y., Zhao, Y., Dong, H., Deas, T. S., Zhou, Y., Li, H., y Shi, P. Y. (2006). West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. *J Virol* 80, 8362-70.
- Reavy, B., Ziegler, A., Diplexcito, J., Macintosh, S. M., Torrance, L., y Mayo, M. (2000). Expression of functional recombinant antibody molecules in insect cell expression systems. *Protein Expr Purif* 18, 221-8.
- Reed, K. D., Meece, J. K., Henkel, J. S., y Shukla, S. K. (2003). Birds, migration and emerging zoonoses: west nile virus, lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clin Med Res* 1, 5-12.
- Reisen, W. K., Brault, A. C., Martinez, V. M., Fang, Y., Simmons, K., Garcia, S., Omi-Olsen, E., y Lane, R. S. (2007). Ability of transstadially infected *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) to transmit West Nile virus to song sparrows or western fence lizards. *J Med Entomol* 44, 320-7.
- Rey, F. A., Heinz, F., Mandl, C., Kunz, C., y Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291-8.
- Rios-Ibarra, C., Blitvich, B. J., Farfan-Ale, J., Ramos-Jiménez, J., Muro-Escobedo, S., Martínez-Rodríguez, H. R., Ortiz-López, R., Torres-López, E., y Rivas-Estilla, A. M. (2010). Fatal human case of West Nile virus disease, Mexico, 2009. *Emerg Infect Dis* 16, 741-742.



- Roberson, J. A., Crill, W. D., y Chang, G. J. (2007). Differentiation of West Nile and St. Louis encephalitis virus infections by use of noninfectious virus-like particles with reduced cross-reactivity. *J Clin Microbiol* 45, 3167-74.
- Robin, G., Chappell, K., Stoermer, M. J., Hu, S. H., Young, P. R., Fairlie, D. P., y Martin, J. L. (2009). Structure of West Nile virus NS3 protease: ligand stabilization of the catalytic conformation. *J Mol Biol* 385, 1568-77.
- Rodríguez Mde, L., Rodríguez, D. R., Blitvich, B. J., López, M. A., Fernández-Salas, I., Jimenez, J. R., Farfán-Ale, J. A., Tamez, R. C., Longoria, C. M., Aguilar, M. I., y Rivas-Estilla, A. M. (2010). Serologic surveillance for West Nile virus and other flaviviruses in febrile patients, encephalitic patients, and asymptomatic blood donors in northern Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10, 151-7.
- Roehrig, J. T. (2003). Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res* 59, 141-75.
- Roehrig, J. T., Nash, D., Maldin, B., Labowitz, A., Martin, D. A., Lanciotti, R. S., y Campbell, G. L. (2003). Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin m antibody in confirmed west nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 9, 376-9.
- Sabattini, M. S., Avilés, G., y Monath, T. P. (1998). Historical, epidemiological and ecological aspects of arbovirus in Argentina. En "Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae" (A. P. A. Travassos da Rosa, P. F. C. Vasconcelos, y J. F. S. Travassos da Rosa, Eds). Instituto Evandro Chagas, Belem, Brasil.
- Salazar, P., Traub-Dargatz, J. L., Morley, P. S., Wilmot, D. D., Steffen, D. J., Cunningham, W. E., y Salman, M. D. (2004). Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death. *J Am Vet Med Assoc* 225, 267-74.
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). "Molecular Cloning: a laboratory manual." Third edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Samina, I., Khinich, Y., Simanov, M., y Malkinson, M. (2005). An inactivated West Nile virus vaccine for domestic geese-efficacy study and a summary of 4 years of field application. *Vaccine* 23, 4955-8.
- Samuel, C. E. (2002). Host genetic variability and West Nile virus susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11555-7.
- Samuel, M. A., y Diamond, M. S. (2005). Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J Virol* 79, 13350-61.
- Samuel, M. A., y Diamond, M. S. (2006). Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol* 80, 9349-60.
- Samuel, M. A., Morrey, J. D., y Diamond, M. S. (2007). Caspase 3-dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis. *J Virol* 81, 2614-23.
- Sanchez-Seco, M. P., y Navarro, J. M. (2005). [Infections due to Toscana virus, West Nile virus, and other arboviruses of interest in Europe]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23, 560-8.
- Sanchez, M. D., Pierson, T. C., Degrace, M. M., Mattei, L. M., Hanna, S. L., Del Piero, F., y Doms, R. W. (2007). The neutralizing antibody response against West Nile virus in naturally infected horses. *Virology* 359, 336-48.
- Schmidt, J. R., y Elmansoury, H. K. (1963). Natural and Experimental Infection of Egyptian Equines with West Nile Virus. *Ann Trop Med Parasitol* 57, 415-27.
- Sejvar, J. J. (2007). The long-term outcomes of human West Nile virus infection. *Clin Infect Dis* 44, 1617-24.

- Sejvar, J. J., Haddad, M. B., Tierney, B. C., Campbell, G. L., Marfin, A. A., Van Gerpen, J. A., Fleischauer, A., Leis, A. A., Stokic, D. S., y Petersen, L. R. (2003). Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA* 290, 511-5.
- Shi, P. Y., Kauffman, E. B., Ren, P., Felton, A., Tai, J. H., Dupuis, A. P., 2nd, Jones, S. A., Ngo, K. A., Nicholas, D. C., Maffei, J., Ebel, G. D., Bernard, K. A., y Kramer, L. D. (2001). High-throughput detection of West Nile virus RNA. *J Clin Microbiol* 39, 1264-71.
- Shi, P. Y., y Wong, S. J. (2003). Serologic diagnosis of West Nile virus infection. *Expert Rev Mol Diagn* 3, 733-41.
- Shimoni, Z., Niven, M. J., Pitlick, S., y Bulvik, S. (2001). Treatment of West Nile virus encephalitis with intravenous immunoglobulin. *Emerg Infect Dis* 7, 759.
- Shirato, K., Miyoshi, H., Goto, A., Ako, Y., Ueki, T., Kariwa, H., y Takashima, I. (2004). Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. *J Gen Virol* 85, 3637-45.
- Shiryaev, S. A., Chernov, A. V., Aleshin, A. E., Shiryaeva, T. N., y Strongin, A. Y. (2009). NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *J Gen Virol* 90, 2081-5.
- Shrestha, B., y Diamond, M. S. (2004). Role of CD8+ T cells in control of West Nile virus infection. *J Virol* 78, 8312-21.
- Shrestha, B., Gottlieb, D., y Diamond, M. S. (2003). Infection and injury of neurons by West Nile encephalitis virus. *J Virol* 77, 13203-13.
- Shrestha, B., Wang, T., Samuel, M. A., Whitby, K., Craft, J., Fikrig, E., y Diamond, M. S. (2006). Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. *J Virol* 80, 5338-48.
- Simister, N. E. (2003). Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 21, 3365-3369.
- Sisk, W. P., Bradley, J. D., Leipold, R. J., Stoltzfus, A. M., Ponce de Leon, M., Hilf, M., Peng, C., Cohen, G. H., y Eisenberg, R. J. (1994). High-level expression and purification of secreted forms of Herpes Simplex virus type I glycoprotein gD synthesized by baculovirus-infected insect cells. *J Virol* 68, 766-775.
- Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke A. W., y Paul J. H. (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 20, 471-492.
- Sotelo, E., Fernandez-Pinero, J., Llorente, F., Agüero, M., Hoefle, U., Blanco, J. M., y Jimenez-Clavero, M. A. (2009). Characterization of West Nile virus isolates from Spain: new insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. *Virology* 395, 289-97.
- Stiasny, K., y Heinz, F. X. (2006). Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol* 87, 2755-66.
- Styer, L. M., Kent, K. A., Albright, R. G., Bennett, C. J., Kramer, L. D., y Bernard, K. A. (2007). Mosquitoes inoculate high doses of West Nile virus as they probe and feed on live hosts. *PLoS Pathog* 3, 1262-70.
- Sutherland, G. L., y Nasci, R. S. (2007). Detection of West Nile virus in large pools of mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 23, 389-95.
- Taketa-Graham, M., Powell Pereira, J., Baylis, E., Cossen, C., Ocegüera, L., Patiris, P., Chiles, R., Hanson, C. V., y Forghani, B. (2010). High throughput quantitative colorimetric microneutralization assay for the confirmation and differentiation of West Nile virus and St. Louis encephalitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 82, 501-4.
- Tan, T. T., Bhuvanakantham, R., Li, J., Howe, J., y Ng, M. L. (2009). Tyrosine 78 of pre-membrane protein is essential for assembly of West Nile virus. *J Gen Virol* 90, 1081-92.

- Tardei, G., Ruta, S., Chitu, V., Rossi, C., Tsai, T. F., y Cernescu, C. (2000). Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection. *J Clin Microbiol* 38, 2232-9.
- Tesh, R. B., Arroyo, J., Travassos Da Rosa, A. P., Guzman, H., Xiao, S. Y., y Monath, T. P. (2002). Efficacy of killed virus vaccine, live attenuated chimeric virus vaccine, and passive immunization for prevention of West Nile virus encephalitis in hamster model. *Emerg Infect Dis* 8, 1392-7.
- Tessier, D. C., Thomas, D. Y., Khouri, H. E., Laliberté, F., y Vernet, T. (1991). Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* 98, 177-83.
- Thomas, S., Redfern, J. B., Lidbury B. A., y Mahalingam, S. (2006). Antibody-dependent enhancement and vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 5, 409-12.
- Throsby, M., Geuijen, C., Goudsmit, J., Bakker, A. Q., Korimbocus, J., Kramer, R. A., Clijsters-van der Horst, M., de Jong, M., Jongeneelen, M., Thijsse, S., Smit, R., Visser, T. J., Bijl, N., Marissen, W. E., Loeb, M., Kelvin, D. J., Preiser, W., ter Meulen, J., y de Kruif, J. (2006). Isolation and characterization of human monoclonal antibodies from individuals infected with West Nile Virus. *J Virol* 80, 6982-92.
- Throsby, M., Ter Meulen, J., Geuijen, C., Goudsmit, J., y de Kruif, J. (2007). Mapping and analysis of West Nile virus-specific monoclonal antibodies: prospects for vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 6, 183-91.
- Tsai, T., Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI (1998). West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 352, 767-771.
- Turell, M. J., Sardelis, M. R., O'Guinn, M. L., y Dohm, D. J. (2002). Potential vectors of West Nile virus in North America. *Curr Top Microbiol Immunol* 267, 241-52.
- Uchil, P. D., Kumar, A. V., y Satchidanandam, V. (2006). Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. *J Virol* 80, 5451-64.
- Ulloa, A., Langevin, S. A., Mendez-Sanchez, J. D., Arredondo-Jimenez, J. I., Raetz, J. L., Powers, A. M., Villareal-Treviño, C., Gubler, D. J., y Komar, N. (2003). Serologic survey of domestic animals for zoonotic arbovirus infections in the Lacandón Forest region of Chiapas, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* 3, 3-9.
- van der Meulen, K. M., Pensaert, M. B., y Nauwynck, H. J. (2005). West Nile virus in the vertebrate world. *Arch Virol* 150, 637-57.
- van Oers, M. M. (2006). Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Advances in Virus Research* 68, 193-253.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., y McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13, 213-7.
- Vazquez, A., Sánchez-Seco, M., Ruiz, S., Molero, F., Hernandez, L., Moreno, J., Magallanes, A., Tejedor, C. G., y Tenorio, A. (2010). Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis* 16, 549-52.
- Venter, M., Human, S., Zaayman, D., Gerdes, G. H., Williams, J., Steyl, J., Leman, P. A., Paweska, J. T., Setzkorn, H., Rous, G., Murray, S., Parker, R., Donnellan, C., y Swanepoel, R. (2009). Lineage 2 west nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa. *Emerg Infect Dis* 15, 877-84.
- Verma, S. K., Kumar, S., Gupta, N., VEDI, S., Bhattacharya, S. M., y Lakshmana Rao, P. V. (2009). Bacterially expressed recombinant envelope protein domain III of Japanese encephalitis virus (rJEV-DIII) elicits Th1 type of immune response in BALB/c mice. *Vaccine* 27, 6905-9.

- Volk, D. E., Beasley, D. W., Kallick, D. A., Holbrook, M. R., Barrett, A. D., y Gorenstein, D. G. (2004). Solution structure and antibody binding studies of the envelope protein domain III from the New York strain of West Nile virus. *J Biol Chem* 279, 38755-61.
- Wang, T., Anderson, J. F., Magnarelli, L. A., Bushmich, S., Wong, S., Koski, R. A., y Fikrig, E. (2001a). West Nile virus envelope protein: role in diagnosis and immunity. *Ann N Y Acad Sci* 951, 325-7.
- Wang, T., Anderson, J. F., Magnarelli, L. A., Wong, S. J., Koski, R. A., y Fikrig, E. (2001b). Immunization of mice against West Nile virus with recombinant envelope protein. *J Immunol* 167, 5273-7.
- Wang, T., y Fikrig, E. (2004). Immunity to West Nile virus. *Curr Opin Immunol* 16, 519-23.
- Wang, T., Magnarelli, L. A., Anderson, J. F., Gould, L. H., Bushmich, S. L., Wong, S. J., y Fikrig, E. (2002). A recombinant envelope protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for West Nile virus serodiagnosis. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2, 105-9.
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E., y Flavell, R. A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10, 1366-73.
- Wang, Y., Lobigs, M., Lee, E., y Mullbacher, A. (2003). CD8+ T cells mediate recovery and immunopathology in West Nile virus encephalitis. *J Virol* 77, 13323-34.
- Wang, Z. M., Tong, L.L., Grant, D., Cihlar, T. (2001). Expression and characterization of soluble human parainfluenza virus type 1 hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Journal of Virological Methods* 98, 53-61.
- Watson, J. T., Pertel, P. E., Jones, R. C., Siston, A. M., Austin, C. C., y Gerber, S. I. (2004). Clinical characteristics and functional outcomes of West Nile Fever. *Ann Intern Med* 141, 360-5.
- Watts, D. M., Tesh, R. B., Siirin, M., Rosa, A. T., Newman, P. C., Clements, D. E., Ogata, S., Collier, B. A., Weeks-Levy, C., Lieberman, M. M. (2007). Efficacy and durability of a recombinant subunit West Nile vaccine candidate in protecting hamsters from West Nile encephalitis. *Vaccine* 25, 2913-8.
- Weaver, S. C., Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85, 328-45.
- Wengler, G. (1981). Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus West Nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication. *Virology* 113, 544-55.
- Wengler, G. (1989). Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *J Virol* 63, 2521-6.
- Wengler, G., Czaya, G., Farber, P. M., y Hegemann, J. H. (1991). In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids. *J Gen Virol* 72 ( Pt 4), 851-8.
- Widman, D. G., Ishikawa, T., Fayzulin, R., Bourne, N., y Mason, P. W. (2008). Construction and characterization of a second-generation pseudoinfectious West Nile virus vaccine propagated using a new cultivation system. *Vaccine* 26, 2762-71.
- Wilson, J. R., de Sessions, P. F., Leon, M. A., y Scholle, F. (2008). West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J Virol* 82, 8262-71.
- Wong, S. J., Boyle, R. H., Demarest, V. L., Woodmansee, A. N., Kramer, L. D., Li, H., Drebot, M., Koski, R. A., Fikrig, E., Martin, D. A., y Shi, P. Y. (2003). Immunoassay targeting nonstructural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue

- and St. Louis encephalitis virus infections and from flavivirus vaccination. *J Clin Microbiol* 41, 4217-23.
- Wong, S. J., Demarest, V. L., Boyle, R. H., Wang, T., Ledizet, M., Kar, K., Kramer, L. D., Fikrig, E., y Koski, R. A. (2004). Detection of human anti-flavivirus antibodies with a west nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay. *J Clin Microbiol* 42, 65-72.
- Work, T. H., Hurlbut, H. S., y Taylor, R. M. (1955). Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am J Trop Med Hyg* 4, 872-88.
- Wu, S. C., Yu, C., Lin, C. W., Chu, I. M. (2003). The domain III fragment of Japanese encephalitis virus envelope protein: mouse immunogenicity and liposome adjuvancity. *Vaccine* 21, 2516-22.
- Xiao, S. Y., Guzman, H., Zhang, H., Travassos da Rosa, A. P., y Tesh, R. B. (2001). West Nile virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): a model for West Nile encephalitis. *Emerg Infect Dis* 7, 714-21.
- Yamshchikov, G., Borisevich, V., Seregin, A., Chaporgina, E., Mishina, M., Mishin, V., Kwok, C. W., y Yamshchikov, V. (2004). An attenuated West Nile prototype virus is highly immunogenic and protects against the deadly NY99 strain: a candidate for live WN vaccine development. *Virology* 330, 304-12.
- Yang, J. S., Ramanathan, M. P., Muthumani, K., Choo, A. Y., Jin, S. H., Yu, Q. C., Hwang, D. S., Choo, D. K., Lee, M. D., Dang, K., Tang, W., Kim, J. J., y Weiner, D. B. (2002). Induction of inflammation by West Nile virus capsid through the caspase-9 apoptotic pathway. *Emerg Infect Dis* 8, 1379-84.
- Yang, M. R., Lee, S. R., Oh, W., Lee, E. W., Yeh, J. Y., Nah, J. J., Joo, Y. S., Shin, J., Lee, H. W., Pyo, S., y Song, J. (2008). West Nile virus capsid protein induces p53-mediated apoptosis via the sequestration of HDM2 to the nucleolus. *Cell Microbiol* 10, 165-76.
- Yaremich, S. A., Warner, R. E., Mankin, P. C., Brawn, J. D., Raim, A., y Novak, R. (2004). West Nile virus and high death rate in American crows. *Emerg Infect Dis* 10, 709-11.
- Zhang, B., Dong, H., Stein, D. A., Iversen, P. L., y Shi, P. Y. (2008). West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions. *Virology* 373, 1-13.
- Zhang, Y., Kaufmann, B., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., y Rossmann, M. G. (2007). Structure of immature West Nile virus. *J Virol* 81, 6141-5.
- Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., Guo, Y., Bernard, K. A., Shi, P. Y., y Li, H. (2007). Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *J Virol* 81, 3891-903.
- Zohrabian, A., Hayes, E. B., y Petersen, L. R. (2006). Cost-effectiveness of West Nile virus vaccination. *Emerg Infect Dis* 12, 375-80.
- Zou, G., Puig-Basagoiti, F., Zhang, B., Qing, M., Chen, L., Pankiewicz, K. W., Felczak, K., Yuan, Z., y Shi, P. Y. (2009). A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. *Virology* 384, 242-52.

### 8.1 Páginas web citadas en el texto (por orden de aparición):

[www.who.int](http://www.who.int)

[www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile)

[www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/birdspecies.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/birdspecies.htm)

[www.ecdc.europa.eu/](http://www.ecdc.europa.eu/)

[www.microbeworld.org](http://www.microbeworld.org)  
[www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org)  
[www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile)  
[www.id-vet.com](http://www.id-vet.com)  
[www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)  
[www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)  
[www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)  
[www.earth.google.com](http://www.earth.google.com)  
[www.dgepi.salud.gob.mx/sinave](http://www.dgepi.salud.gob.mx/sinave)  
[www.portal.salud.gob.mx](http://www.portal.salud.gob.mx)  
[www.cdc.gov/westnile](http://www.cdc.gov/westnile)







## **Anexo**



---

## SHORT REPORT

### The continuous spread of West Nile virus (WNV): seroprevalence in asymptomatic horses

---

J. ALONSO-PADILLA<sup>1</sup>, E. LOZA-RUBIO<sup>2</sup>, E. ESCRIBANO-ROMERO<sup>1</sup>,  
L. CÓRDOBA<sup>1</sup>, S. CUEVAS<sup>2</sup>, F. MEJÍA<sup>2</sup>, R. CALDERÓN<sup>2</sup>, F. MILIÁN<sup>2</sup>,  
A. TRAVASSOS DA ROSA<sup>3</sup>, S. C. WEAVER<sup>3</sup>, J. G. ESTRADA-FRANCO<sup>3</sup>  
AND J. C. SAIZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain*

<sup>2</sup> *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias (CENID-Microbiología), Colonia Palo Alto, Mexico*

<sup>3</sup> *Department of Pathology and Center for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA*

(Accepted 3 February 2009; first published online 17 March 2009)

#### SUMMARY

West Nile virus (WNV) was probably introduced in southern and northern Mexico from the USA in two independent events. Since then, WNV activity has been reported in several Mexican states bordering the USA and the Gulf of Mexico, but disease manifestations seen there in humans and equids are quite different to those observed in the USA. We have analysed WNV seroprevalence in asymptomatic, unvaccinated equids from two Mexican states where no data had been previously recorded. WNV IgG antibodies were detected in 31·6% (91/288) of equine sera from Chiapas and Puebla states (53·3% and 8·0%, respectively). Analysis by plaque reduction neutralization test (PRNT) showed good specificity (99·4%) and sensitivity (84·9%) with the ELISA results. Further analyses to detect antibodies against three different flaviviruses (WNV, St Louis encephalitis virus, Ilheus virus) by haemagglutination inhibition (HI) tests on a subset of 138 samples showed that 53% of the 83 HI-positive samples showed specific reaction to WNV. These data suggest continuous expansion of WNV through Mexico.

**Key words:** Emerging viruses, serology, viral expansion, viruses, zoonoses.

West Nile virus (WNV), a flavivirus of the Flaviviridae family [1, 2], was first isolated in Uganda in 1937 [3]. WNV is endemic in Africa, the Middle East and western Asia and, nowadays, also in North America, where it was first reported in 1999 [2, 4]. The virus is responsible for encephalitis outbreaks involving birds, horses and humans, and it has caused over

1000 human deaths in the USA (<http://www.cdc.gov>). Since 1999, WNV has dispersed widely and it has already been isolated in Central and South America [2, 4, 5]. Its natural transmission cycle is maintained in a cycle between mosquitoes, mainly from the *Culex* genus, and birds. However, other vertebrates such as humans and horses are incidental hosts, as they do not reach viraemia levels high enough to infect feeding mosquitoes [4].

The first serological evidence of WNV activity in Mexican horses was observed in 2002 in states that

\* Author for correspondence: Dr J. C. Saiz, Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ctra. Coruña km. 7.5, 28040 Madrid, Spain.  
(Email: jcsaiz@inia.es)

# Expression and Immunoreactivities of Hepatitis E Virus Genotype 3 Open Reading Frame-2 (ORF-2) Recombinant Proteins Expressed in Insect Cells

Nereida Jiménez de Oya · Inmaculada Galindo ·  
Estela Escribano-Romero · Ana-Belén Blázquez ·  
Julio Alonso-Padilla · Nabil Halaihel ·  
José M. Escribano · Juan-Carlos Saiz

Received: 29 January 2009 / Accepted: 18 March 2009 / Published online: 31 March 2009  
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

**Abstract** Hepatitis E virus (HEV) is a fecal-orally transmitted virus that is endemic in many geographical areas with poor sanitary conditions and inadequate water supplies. In Europe, a low-endemic area, an increased number of autochthonous sporadic human cases of patients infected with HEV strains of genotype 3, have been reported lately. The relatively high prevalence of HEV genotype 3 infections in European pigs has raised concerns about a potential zoonotic transmission to humans. Determination of HEV seroprevalence in pigs would help to clarify its incidence and possible zoonotic implications. To this purpose, we have expressed and partially characterized swine genotype 3 HEV open reading frame-2 proteins upon infection of Sf21 insect cells with recombinant baculoviruses. The use of the expressed proteins as diagnostic antigens for the detection of antibodies to HEV has been further assayed with human and swine sera.

**Keywords** Zoonosis · Emerging virus · Immunogenicity · ELISA

## Introduction

Hepatitis E is an infection with clinical and epidemiological features of acute hepatitis. The causative agent, the hepatitis E virus (HEV), is a spherical, non-enveloped viral particle of around 32–34 nm in diameter, the genome of which is a single-stranded RNA molecule of positive polarity of approximately 7.2 kb, containing three overlapping open reading frames (ORF) and a 3' poly (A) tail (Pintó and Saiz 2007; Worm et al. 2002).

HEV is a fecal-orally transmitted pathogen that causes frequent epidemics in areas with inadequate water supplies and poor sanitary conditions (Pintó and Saiz 2007). However, an increased number of indigenous HEV cases have recently been reported in several European countries (Borgen et al. 2008; Buti et al. 2004; Dalton et al. 2008; Herremans et al. 2007a; Mansuy et al. 2004; Preiss et al. 2006; Widdowson et al. 2003). In contrast to what is seen in endemic areas, where the infecting viruses usually belong to genotype 1 or 2, these indigenous infections are mainly caused by genotype 3 strains (Pintó and Saiz 2007; Worm et al. 2002).

The detection of HEV infection in pigs that shed high quantities of virus in feces and the genetic similarity between human and swine strains from the same geographical region raised concerns about a possible zoonotic potential for HEV (Meng 2003), which was further confirmed in people who ate uncooked deer meat or liver from pork or wild boar (Tei et al. 2003; Yazaki et al. 2003; Matsuda et al. 2003). Latter on, HEV-RNA and infectious virus have been detected in commercial pig livers sold in local grocery stores (Bouwknegt et al. 2007b; Feagins et al. 2007; Yazaki et al. 2003).

In addition, several studies have found a higher prevalence of HEV antibodies in veterinarians and swine farmers than in control groups, suggesting that people in close contact with

N. Jiménez de Oya · I. Galindo · E. Escribano-Romero ·  
A.-B. Blázquez · J. Alonso-Padilla · J. M. Escribano ·  
J.-C. Saiz (✉)

Department of Biotechnology, Instituto Nacional de  
Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA),  
Ctra. Coruña km. 7.5, 28040 Madrid, Spain  
e-mail: jcsaiz@inia.es

N. Halaihel  
Department of Infectious Pathology and Epidemiology, Faculty  
of Veterinaria, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain