

VIRUS WEST NILE: EPIDEMIOLOGI, KLASIFIKASI DAN DASAR MOLEKULER

WEST NILE VIRUS: EPIDEMIOLOGY, CLASSIFICATION AND MOLECULAR BASIC

Bina Ikawati, Dyah Widiastuti, Puji Astuti
Balai Litbang P2B2 Banjarnegara
Jl. Selamanik No. 16A Banjarnegara, Jawa Tengah, Indonesia
E_mail: bina.ikawati@gmail.com

Received date: 16/5/2014, Revised date: 11/11/2014, Accepted date: 13/11/2014

ABSTRAK

Virus west nile (WN) dapat menimbulkan penyakit yang ditularkan melalui nyamuk. Di Indonesia virus west nile mulai diperhatikan karena menginfeksi 12 warga Surabaya pada tahun 2014. Pemahaman mengenai virus west nile ditinjau dari aspek epidemiologi, klasifikasi dan dasar molekuler diperlukan untuk mengenal apa dan bagaimana sifat dari virus WN dalam rangka upaya deteksi dini dan pencegahan terjadinya KLB virus WN. Tulisan ini merupakan telaah dengan mengumpulkan informasi dari berbagai jurnal dan buku teks mengenai virus west nile. Secara epidemiologi virus dapat tersebar melalui vektor nyamuk utamanya *Culex* sp., dan *Aedes* sp. sebagai vektor sekunder. Virus ini di alam juga ditemukan pada burung/unggas. Penularan virus melalui gigitan nyamuk yang terinfeksi ke hewan dan manusia. Virus west nile merupakan anggota famili Flaviviridae dari genus *Flavivirus*. Virus ini memiliki genom yang terdiri dari satu single-stranded (ss) RNA yang dikelilingi suatu nucleocapsid berbentuk icosahedral atau isometric. Genom virus west nile memiliki panjang 11.029 nukleotida. Upaya pencegahan terhadap infeksi virus WN dapat dilakukan dengan mengendalikan populasi nyamuk, mengurangi gigitan nyamuk, dan secara berkala melakukan survei pada unggas/burung utamanya yang dipelihara dalam skala besar maupun yang sedang bermigrasi.

Kata kunci: virus west nile, epidemiologi, klasifikasi, dasar molekuler

ABSTRACT

*West nile (WN) virus can cause a disease transmitted by mosquitoes. West nile virus in Indonesia should be noted because it has infected 12 people in the early 2014. A good understanding of west nile virus in terms of epidemiology, classification and molecular basis was needed to know about WN virus properties and ultimately early detection and prevention of WN virus outbreaks can be performed precisely. A literature review was arranged by collecting information from various journals and textbooks about west nile Virus. WN virus can be transmitted by *Culex* sp. as the main mosquito vector, however *Aedes* sp. also potential as secondary vector. WN virus presence was maintained in nature through its life cycle in birds or poultry. The transmission can only occur through an infected mosquito biting to other animals and humans. West nile virus is a member of genus *Flavivirus* from family Flaviviridae. West nile virus has a genome consisted of a single-stranded (ss) RNA surrounded by an icosahedral nucleocapsid. West nile virus genome has 11,029 nucleotides. Prevention efforts toward WN virus infection can be done by performing mosquito control, reducing mosquito bites, and conducting periodical surveys in migrating birds or large-scale poultry.*

Key words: west nile virus, epidemiology, classification, molecular basic

PENDAHULUAN

Virus west nile adalah virus yang dapat menimbulkan penyakit dan ditularkan melalui nyamuk di daerah beriklim sedang dan tropis. Virus ini pertama kali diidentifikasi di sungai Nil bagian barat Uganda, Afrika Timur, pada tahun 1937. Sebelum pertengahan 1990-an, penyakit ini hanya terjadi sporadis dan hanya berisiko kecil bagi manusia, sampai terjadi wabah di Aljazair pada tahun 1994 dan wabah besar di Rumania pada tahun 1996

dengan kasus ensefalitis (peradangan akut pada otak).¹

Virus west nile saat ini telah menyebar secara global, dengan kasus pertama di bagian barat diidentifikasi di New York City pada tahun 1999. Penyebaran virus di benua Amerika Serikat, dari utara Kanada sampai kepulauan Karibia dan Amerika Latin. Virus ini juga telah menyebar ke Eropa, di daerah luar Mediterania. Virus west nile kini endemik di Afrika, Asia, Australia, Timur

Tengah, Eropa, dan terutama di Amerika Serikat yang pada tahun 2012 mengalami wabah terburuk. Pada tahun 2012, virus west nile (WN) menewaskan 286 orang di Amerika Serikat, dengan negara bagian Texas merupakan kawasan paling parah terinfeksi oleh virus ini.¹

Hasil penelitian Mynt menunjukkan bahwa virus WN ditemukan pada serum pasien demam akut di Pulau Jawa yang dikoleksi sejak tahun 2004 hingga 2005. Secara genotip, virus tersebut teridentifikasi sebagai virus WN lineage 2.² Keberadaan virus west nile di Indonesia harus diperhatikan karena pada tahun 2014 virus tersebut telah menginfeksi 12 warga Surabaya yang dirawat intensif di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya melalui gigitan nyamuk *Culex*. Virus West Nile ini terindikasi oleh dokter yang tergabung dalam *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga, Surabaya.³

METODE

Review dilakukan dengan mengumpulkan informasi dari berbagai jurnal, artikel ilmiah dan buku teks mengenai virus west nile. Seluruh data dikompilasi dan disusun secara sistematis deskriptif untuk memberikan gambaran menyeluruh mengenai virus west nile yang meliputi epidemiologi, klasifikasi, dan dasar molekuler.

PEMBAHASAN

Epidemiologi

Pada manusia, masa inkubasi virus WN antara 1-6 hari. Umumnya penyakit ini ringan dengan gejala klinik demam, menggigil, nyeri kepala, nyeri punggung, nyeri otot secara menyeluruh, dan sulit tidur. Disamping itu, dapat pula ditemukan gejala gangguan gastrointestinal seperti mual, muntah, diare, dan nyeri lambung. Kemudian suhu badan penderita dapat mencapai 40°C atau lebih. Pada umumnya, penderita akan pulih sepenuhnya. Pada beberapa kasus, terutama pada orang-orang berusia lanjut, akan berkembang menjadi ensefalitis ataupun meningitis (infeksi pada lapisan otak dan urat saraf tulang belakang) yang berisiko menyebabkan kematian. Diagnosis yang akurat akan membantu penderita untuk tidak mengalami tahap yang lebih parah dari infeksi virus West Nile.³

Virus WN dapat menyebabkan komplikasi berat pada semua golongan usia dan kondisi kesehatan apapun sehingga sangat penting untuk

mengurangi risiko terjadinya infeksi. Virus ini keberadaannya di alam terpelihara oleh burung dan nyamuk. Terdapat lebih dari 60 spesies nyamuk yang dapat menularkan virus WN. Di Amerika Utara dan Eropa ditemukan nyamuk penular utamanya dari genus *Culex*, yaitu *Culex pipiens complex* yang *ornithophilic* (menyukai darah burung/unggas).⁴ Hasil penelitian di laboratorium menunjukkan *Aedes* spp. berpotensi pula sebagai vektor virus WN.⁵ Penularan virus WN harus melalui vektor yaitu nyamuk. Unggas yang terinfeksi berinteraksi dengan vektor agar dapat menularkan ke hewan lain dan manusia. Kontak langsung antara unggas yang diinfeksi virus WN tidak terjadi karena tidak ditemukannya antibodi dan virus pada tubuh unggas.⁵ Vektor akan terinfeksi bila menghisap darah unggas yang terinfeksi virus WN dan virus akan berkembangbiak dalam beberapa hari pada tubuh nyamuk, dan membawanya ke kelenjar air liur yang siap ditularkan ke unggas atau manusia melalui gigitannya. Pada unggas yang telah terinfeksi, viremia dapat bertahan selama 4 hari, dan bila burung tersebut sembuh maka antibodi akan terbentuk dan bertahan sangat lama.⁶

Pencegahan penularan virus WN dapat dilakukan melalui peningkatan kegiatan surveilans. Surveilans vektor dapat dilakukan melalui pengendalian populasi nyamuk serta mencegah gigitan nyamuk. Pengamatan terhadap lingkungan utamanya pada unggas yang dipelihara dalam jumlah banyak (ekstensif) dan burung liar perlu pula diwaspadai adanya virus WN. Hasil penelitian menunjukkan burung yang dipelihara secara intensif lebih sedikit kemungkinan untuk positif virus WN. Unggas yang terkena virus WN dapat tidak menimbulkan gejala sakit dan apabila bergejala mempunyai ciri gejala syaraf seperti, perdarahan pada miokardium, dan perdarahan dan nekrosis pada saluran pencernaan. Unggas yang terkena virus WN tidak dapat menularkan virus tersebut secara langsung.⁶

Klasifikasi

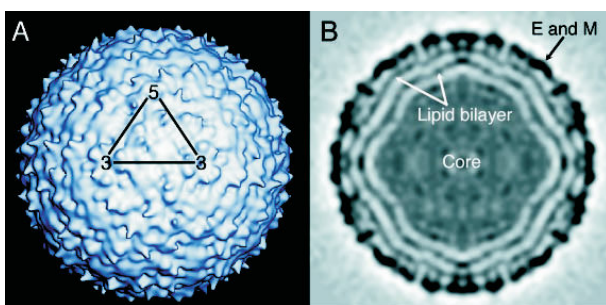
Virus West Nile merupakan anggota *family* Flaviviridae dari genus Flavivirus. Famili Flaviviridae terbagi menjadi 3 genera yaitu: *Flavivirus*, *Pestivirus* dan *Hepacivirus*. Genus *Pestivirus* terdiri dari 4 spesies virus yang merupakan kelompok patogen pada hewan antara lain: *Bovine Viral Diarrhea Virus* tipe 1 dan 2,

Border Disease Virus dan *Classical Swine Fever Virus*. Genus *Hepacivirus* hanya terdiri dari satu spesies yaitu virus Hepatitis C. Genus *Flavivirus* memiliki anggota yang paling banyak yaitu lebih dari 53 spesies, yang terbagi menjadi 12 kelompok yang saling berhubungan secara serologis. Virus West Nile merupakan salah satu spesies dari genus *Flavivirus* selain beberapa spesies yang lain seperti virus Dengue, Japanese Encephalitis, St. Louis Encephalitis, Murray Valley Encephalitis.⁷ Seluruh isolat virus West Nile berasal dari satu serotip namun terbagi dalam dua lineage (garis keturunan) yaitu *lineage 1* dan *2*.⁸ Perbedaan antar *lineage 1* dan *2* terletak pada substitusi dan delesi asam amino yang menyusun protein *envelope*. Virus west nile *lineage 1* berasosiasi dengan penyakit pada manusia di dunia, sedangkan *lineage 2* hanya menginfeksi di daerah endemis enzootik Afrika.⁹

Dasar Molekuler

Genom dan protein virus

Virus west nile memiliki genom yang terdiri dari satu *single-stranded* (ss) RNA yang dikelilingi suatu nucleocapsid berbentuk icosahedral atau isometrik. Genom virus west nile memiliki panjang 11.029 nukleotida. Sekuen nukleotida dari virus West Nile telah diketahui mengkode tiga protein struktural yang meliputi protein kapsid (C), protein *membrane* (M), dan *envelope* (E). Selain itu, genom virus West Nile juga mengkode tujuh protein non struktural (NS). Secara keseluruhan, protein yang dikode oleh genom virus West Nile adalah 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2BNS3-NS4A-NS4B-NS5-3'.⁷



Gambar 1. Struktur Virus West Nile yang Diamati di Bawah Cryo-Electron Mikroskop. Permukaan virion dengan salah satu unit icosahedron asimetris yang ditandai dengan gambar segitiga. Arah pelipatan icosahedron ditunjukkan dengan label 5 dan 3 (A). Potongan melintang menunjukkan lapisan *concentric* yang padat. Virion core, lipid bilayer dan protein E serta protein M dapat dibedakan dengan jelas (B).³⁰

Beberapa penelitian virus WN difokuskan pada gen penyandi protein E yang berperan penting dalam proses perlekatan virus dan proses masuknya virus dalam sel inang. Protein E bertindak sebagai target sistem imun dan memiliki variasi genetik yang tinggi.¹⁰ Protein M disintesis dalam bentuk prekursor protein (preM). Prekursor ini akan diproses menjadi protein M dengan enzim convertase (furin) ketika virus telah mengalami maturasi.¹¹ Kapsid virus West Nile berdiameter sekitar 30 nm dan terdiri dari dimer protein C yang merupakan komponen dasar penyusun nukleokapsid.⁸ Protein C ini terletak di dalam virion dan tidak berhubungan dengan protein E dan M yang berada di sisi dalam envelop virion. Walaupun partikel nukleokapsid terdiri dari protein C, namun dimer protein ini dapat dipisahkan dari struktur nukleokapsid dengan perlakuan garam dalam konsentrasi tinggi.¹²

Protein NS1 merupakan suatu glikoprotein yang berperan penting dalam *viability* virus karena memiliki ikatan disulfida.¹³ NS1 berfungsi sebagai kofaktor dalam proses replikasi RNA virus dan merupakan satu-satunya protein nonstruktural yang disekresi dalam jumlah yang banyak (lebih dari 50 µg/ml) dalam serum pasien yang terinfeksi. Protein ini juga diketahui berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit.¹⁴ Banyak teori telah dikembangkan terkait kontribusi protein NS1 terhadap mekanisme patogenik virus West Nile diantaranya bahwa [1] protein tersebut dapat memicu terbentuknya reaksi autoantibodi yang berbahaya dalam tubuh inang,¹⁴ [2] antibodi anti NS1 akan menyerang sel-sel dalam jaringan tubuh inang itu sendiri¹⁶ atau [3] adanya protein NS1 akan menurunkan respon imun pasien terhadap virus West Nile dengan mengurangi pengenalan terhadap sel terinfeksi melalui sistem komplemen.¹⁷

NS2A merupakan protein membran hidrofobik yang berperan penting dalam replikasi RNA dan proses perakitan partikel virus.¹⁸ NS2A juga merupakan suppressor utama proses transkripsi interferon beta (IFN-β). Protein ini akan menghambat respon interferon yang pada dasarnya merupakan pertahanan awal di tubuh inang.¹⁹

NS2B merupakan protein dengan berat molekul 15 kDa yang berperan untuk memfasilitasi aktivitas protease protein NS3.20 NS2B berfungsi memfasilitasi proses folding protein NS3 berjalan secara ideal sehingga protein tersebut dapat bekerja sebagai enzim protease.^{21,22}

NS3 merupakan protein yang cukup besar dengan berat molekul 70 kDa dan memiliki dua fungsi enzimatis yaitu sebagai protease²³ dan sebagai ATPase.²⁴ Protease memediasi proses proteolitik prekursor poliprotein dengan cara memotong pada bagian C-terminal.²³ Sedangkan ATPase berperan dalam proses replikasi RNA virus dengan cara memfasilitasi aktivitas polymerase protein NS5.²⁵

Fungsi protein NS4A belum diketahui secara pasti namun telah ditemukan beberapa bukti bahwa protein ini berperan sebagai “organizer” proses replikasi kelompok *Flavivirus*. NS4A bertindak sebagai kofaktor untuk enzim ATPase dari protein NS3.²⁶

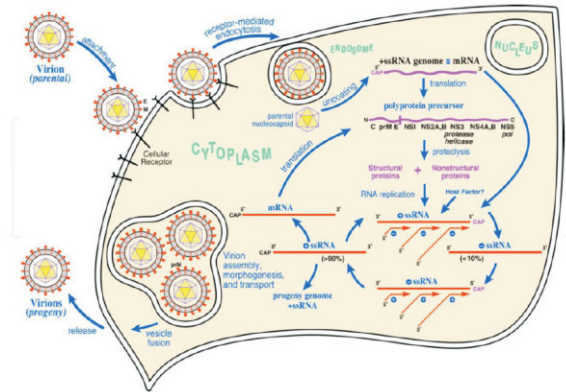
NS4B merupakan protein hidrofobik dengan berat molekul sekitar 27 kDa yang fungsinya juga belum banyak diketahui. Salah satu fungsinya adalah menghambat *interferon-signaling cascade* sehingga menurunkan respon imunitas inang terinfeksi.²⁷

NS5 merupakan protein yang berkedudukan di bagian C-terminal dari poliprotein virus west nile. Protein ini memiliki ukuran yang paling besar dan paling *conserved* diantara virus-virus dalam kelompok *Flavivirus*. Bagian N-terminal protein NS5 mengandung domain S-adenosyl methionine methyltransferase (MTase) yang merupakan penyusun *cap* RNA virus. *Cap* RNA merupakan struktur unik yang ditemukan pada ujung 5' RNA virus dan mRNA sel eukariot, yang berfungsi menjaga stabilitas RNA dan menjadi tempat perlekatan dengan ribosom pada saat proses translasi.²⁸ Adapun bagian C-terminal NS5 mengandung enzim RNA-dependent RNA polymerase yang sangat dibutuhkan pada sintesis RNA genom.²⁹

Siklus replikasi

Virus WN mampu bereplikasi di berbagai kultur sel dari berbagai spesies (mamalia, aves, amfibi dan serangga). Tahap pertama dalam proses masuknya virus ke dalam sel inang adalah perlekatan protein E virus pada molekul reseptor selular.³⁰ Setelah melekat melalui reseptor selular, virus memasuki sel melalui *clathrin-mediated endocytosis* dan membentuk endosome (Gambar 2).³¹ Endosom tersebut berada dalam kondisi pH rendah yang kemudian memicu konformasi molekul glikoprotein dari protein E sehingga protein E berubah dari bentuk homodimer menjadi monomer. Protein E memasukkan lekukan fusi (*fusion loops*) ke dalam membran endosom hingga membentuk lubang fusi

(fusion pore). Lubang fusi tersebut akan semakin membesar sehingga nukleokapsid virus ke luar dari envelop virion dan masuk ke sitoplasma sel inang. Lepasnya nukleokapsid dari envelop virion dikenal dengan proses *uncoating*. Selanjutnya RNA virus akan dikeluarkan oleh nukleokapsid kemudian ditranslasi menghasilkan poliprotein dan dilanjutkan dengan proses perakitan virion-virion baru yang siap dikeluarkan dari dalam sel inang.³²



Gambar 2. Siklus Replikasi Virus West Nile dalam Sel Inang²⁷

KESIMPULAN

Secara epidemiologi virus WN dapat tersebar dengan vektor nyamuk utamanya *Culex* sp., namun demikian *Aedes* sp. juga berpotensi sebagai vektor. Keberadaan virus ini di alam terpelihara pada burung/unggas. Menyerang semua golongan umur dan jenis kelamin, bersifat asimtomatis atau menimbulkan gejala klinik. Manifestasi terberat adalah encephalitis dan meningitis. Virus west nile merupakan anggota famili Flaviviridae dari genus *Flavivirus*. Virus ini memiliki genom yang terdiri dari satu *single-stranded* (ss) RNA yang dikelilingi suatu nucleocapsid berbentuk icosahedral atau isometric. Genom virus west nile memiliki panjang 11.029 nukleotida.

Upaya pencegahan adalah mengendalikan populasi nyamuk, mengurangi gigitan nyamuk, dan secara berkala melakukan survei pada unggas/burung utamanya yang dipelihara dalam skala besar maupun yang sedang bermigrasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Nasonudin. Kini saatnya Indonesia mewaspadaai penyakit virus west nile. Kompas. 29 Oktober 2013; halaman 14.

2. Myint KS, Kosasih H, Artika IM, Perkasa A, Puspita M, Ma'roef CN, et al. West nile virus documented in Indonesia from acute febrile illness specimens. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 90 (2): 260-2.
3. Nurcahyani DI. 12 warga Surabaya terinfeksi virus west nile. [Diakses 25 April 2014]. Diunduh dari: <http://health.okezone.com/read/2014/01/09/482/924113/dua-warga-surabaya-terinfeksi-virus-west-nile>.
4. Gray TJ, Cameron EW. A review of the epidemiological and clinical aspect of west nile viruses. *Internatioanl Journal of General Medicine.* [Diakses 2 Mei 2014]. Diunduh dari: <http://dx.doi.org/10.2147/IJGM.S59902>.
5. Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, Oguinn ML, Andreadis TG, Blow JA. An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit west nile virus. *J Med Entomol.* 2005; 42 (1): 57–62.
6. Sendow I, Noor SM. Virus west nile sebagai salah satu penyakit emerging zoonosis. *Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis.*
7. International Committee on Taxonomy of Viruses [homepage on the Internet]. USA, Virology Division of the International Union of Microbiological Societies [cited 2014 April 30]. Available from: <http://ictvonline.org/index.asp>.
8. Margo AB. Replication cycle and molecular biology of the west nile virus. *Viruses.* 2014; 6: 13-53.
9. Lyle RP, Roehrig JT. West nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerging Infectious Diseases.* 2001; 7 (4).
10. Chambers TJ, Halevy M, Nestorowicz A, Rice CM, Lustig S. West nile virus envelope proteins: nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness. *Journal of General Virology.* 1998; 79: 2375–80.
11. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat. Struct. Biol.* 2003; 10: 907–12.
12. Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *J. Virol.* 2004; 78: 8078–84.
13. Chung KM, Nybakken GE, Thompson BS, Engle MJ, Marri A, Fremont DH, et al. Diamond, antibodies against west nile virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc γ receptor dependent and independent mechanisms. *Journal of Virology.* 2006; 1340–51.
14. Macdonald J, Tonry J, Hall RA, Williams B, Palacios G, Ashok MS, et al. NS1 protein secretion during the acute phase of west nile virus infection. *J. Virol.* 2005; 79 (22): 13924-33.
15. Chang HH, Shyu HF, Wang YM, Sun DS, Shyu RH, Tang SS, et al. Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1): arginineglycine-aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. 2002. *J. Infect. Dis.* 2002; 186 (6): 743-51.
16. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol;* 2002; 169: 657-64.
17. Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend RR, Fremont DH, et al. West nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103 (50): 19111-6.
18. Liu WJ, Chen HB, Khromykh AA Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J. Virol.* 2003; 77 (14): 7804-13.
19. Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA. 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.* 2006; 80 (5): 2396-404.
20. Chambers TJ, Grakoui A, Rice CM. Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: a catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. *J Virol.* 1991; 65: 6042-50.
21. Condotta SA. Molecular and cellular studies of the west nile virus NS2B/NS3 protease. Thesis. The Faculty Of Graduate Studies (Microbiology and Immunology). University Of British Columbia; 2010.

22. Shiryayev SA, Ratnikov BI, Chekanov AV, Sikora S, Rozanov DV, Godzik A, et al. Cleavage targets and the D-arginine-based inhibitors of the West Nile virus NS3 processing proteinase. *Biochem J.* 2006; 393: 503-11.
23. Wengler G, Czaya G, Farber PM, Hegemann JH. 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.* 1991; 72 (4): 851-8.
24. Borowski P, Niebuhr A, Mueller O, Bretner M, Felczak K, Kulikowski T, et al. 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.* 2001; 75 (7): 3220-9.
25. Chernov AV, Shiryayev SA, Aleshin AE, Ratnikov BI, Smith JW, Liddington RC, et al. The two-component NS2B-NS3 proteinase represses DNA unwinding activity of the west nile virus NS3 helicase. *J Biol Chem.* 2008; 283: 17270-8.
26. Shiryayev SA, Chernov AV, Aleshin AE, Shiryayeva TN, Strongin AY. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the nonstructural protein NS4A from West Nile virus. *J. Gen. Virol.* 2009; 90 (9): 2081-5.
27. Ambrose RL, Mackenzie JM. West nile virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion. *J. Virol.* 2011; 85: 2723–32.
28. Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* 2002; 21 (11): 2757-68.
29. Grun JB, Brinton MA. Characterization of west nile virus RNA-dependent RNA polymerase and cellular terminal adenylyl and uridylyl transferases in cell-free extracts. *J. Virol.* 1986; 60 (3): 1113-24.
30. Valiakos G, Athanasiou LV, Touloudi A, Papatsiros V, Spyrou V, Petrovska L, et al. West nile virus: basic principles, replication mechanism, immune response and important genetic determinants of virulence. Chapter 2. 2013.
31. Chu JJH, Ng ML. Infectious entry of west nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Virol.* 2004; 78 (19): 10543-55.
32. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses.* 2011; 3(2): 160-71.