

Capítulo 4

Detección del Virus del Oeste del Nilo en *Cx. quinquefasciatus* del estado de Nuevo León, México

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo con el fin de monitorear la actividad del Virus de la Encefalitis del Oeste del Nilo (VON) en mosquitos del estado de Nuevo León, Noreste de México. La fiebre del Oeste del Nilo (VON) es una enfermedad causada por el Virus de la familia Flaviviridae, género Flavivirus, además pertenece al serocomplejo de la Encefalitis Japonesa (EJ). Es una enfermedad transmitida por vectores que se propaga a una amplia gama de vertebrados a través de mosquitos infectados y garrapatas. Al igual que los casos en humanos, las primeras aves infectadas por el VON en el hemisferio occidental se identificaron en agosto de 1999 en New York; y el principal vector identificado fue el mosquito *Cx. pipiens*. En el estado de Nuevo León se colectó, por varios métodos a *Cx. quinquefasciatus* y otros culícidos en varias localidades de los municipios de Guadalupe, Escobedo y Pesquería, se colectaron un total de 238 grupos (pool) de mosquitos de los cuales 82 correspondían a *Cx. quinquefasciatus* y uno de ellos, de Pesquería, resultó positivo al VON, por lo que es el primer paso para considerar a este mosquito como un vector puente potencial de este virus.

INTRODUCCION

El virus del Oeste del Nilo es un virus de ARN de cadena sencilla, con sentido positivo y pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae* (Petersen, et al., 2001, Campbell, et al., 2002). Pertenece al serocomplejo de la encefalitis japonesa (JE) que incluye a Encefalitis del Valle Murray y Encefalitis de San Luis (Petersen, et al., 2001). Rappole, et al., (2000) mencionó que el virus del Oeste del Nilo fue identificado por primera vez como un patógeno, en la sangre de una mujer febril en la región del Distrito del Oeste del Nilo en Uganda en 1937.

Es una enfermedad transmitida por vectores, que se propaga a una amplia gama de vertebrados a través de mosquitos infectados y garrapatas. Debido a la proximidad espacial y temporal de las infecciones de aves y humanos, los epidemiólogos han llegado a la conclusión que la transmisión sigue un ciclo enzoótico, en los que participan mosquitos como vectores, aves como reservorios; y ciclos epizooticos en donde intervienen humanos y otros mamíferos como hospederos terminales (Campbell, et al., 2002).

Los principales vectores del VON son las especies de mosquito del género *Culex*, además de algunos otros géneros como *Aedes* y *Anopheles* y *Ochlerotatus*. Muchas especies de aves silvestres actúan como hospederos reservorios (Komar, 2003) y generalmente el virus no causa algún efecto desfavorables en ellas en sus áreas de distribución natural, pero en los recientes brotes se han reportado una gran mortalidad en aves (Petersen, et al., 2001, Campbell, et al., 2002).

Cx. quinquefasciatus en estudios de laboratorio ha demostrado ser un vector del Virus del Oeste del Nilo eficiente (Turell, et al., 2000, Goddard, et al., 2002). Reisen, et al., 2004 detectó al VON en grupos (pools) de este mosquito en varas localidades del sur de California y mencionó que circulaba también en Arizona, EUA y Baja California, México. Las evidencias de la actividad del VON en México han sido documentadas para Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas en caballos y aves durante el periodo del 2002-2003 (Blitvich, et al., 2003, Blitvich, et al., 2004, Fernández-Salas, et al., 2003).

Para determinar el riesgo potencial de *Cx. quinquefasciatus* para servir como vector puente entre aves y humanos en el Noreste de México se colectaron mosquitos de varias especies en varios sitios cercanos a el área Metropolitana de Monterrey, los cuales se le sometió a varios ensayos para determinar si eran positivos al VON.

OBJETIVOS

1. - Determinar las especies de mosquitos presentes en los sitios de estudio, además de *Cx. quinquefasciatus*.
2. – Determinar por medio de varios ensayos la presencia del Virus del Oeste del Nilo en los mosquitos colectados.

HIPOTESIS

El mosquito *Cx. quinquefasciatus* se encontrara positivo al Virus del Oeste del Nilo, por lo que será el primer paso para considerar a este mosquito como un vector puente potencial de este virus.

ANTECEDENTES

Sintomatología de la Infección del VON en Humanos

La mayoría de las infecciones humanas son moderadas y los síntomas incluyen fiebre, cefalea y dolor muscular; a menudo se presentan erupciones en la piel y ganglios inflamados. Las infecciones más severas pueden presentar cefalea, fiebre alta, rigidez en el cuello, estupor, desorientación, coma, convulsión, debilidad muscular, parálisis y ocasionalmente la muerte. La mayoría de las personas infectadas con el virus no han tenido síntomas o padecen de manifestaciones parecidas a la Influenza. Muchos se recuperan completamente y no ven en esta enfermedad un gran peligro para la salud o la vida. La muerte ocurre típicamente entre el 3 - 15% de los casos, sin embargo, el promedio de epidemia hacia este punto indica una tasa de mortalidad exactamente por encima del 10%. Las personas con alto riesgo para la infección aguda y muerte, son los ancianos y los niños y aquellos con un sistema inmunológico deficientes como los pacientes de VIH o los que reciben quimioterapia (PAHO, 2001).

Historia del VON

El virus del Nilo Occidental (VON) se aisló por primera vez en 1937 de la sangre periférica de una mujer en el Oeste la provincia del Nilo de Uganda en África Central. Desde entonces se ha reportado al virus de VON de África del Norte (Egipto, Israel); África Central, Oriental y Sur; Asia (India, Pakistán); Borneo; Europa (Chipre, Francia, Rumania) y, el más recientemente en los E.U. Las pruebas para el anticuerpo a VON sugieren que también ha estado presente en Tailandia, las Filipinas, Malasia, Turquía y Albania. El VON es miembro de la familia Flaviviridae y se relaciona estrechamente a los virus de la encefalitis Japonesa del Viejo Mundo y al virus de la encefalitis San Luis (SLE) del Nuevo Mundo. Además, VON presenta reacción cruzada en una variedad de pruebas serológicas, incluso el análisis de reducción de neutralización de placas, con la Encefalitis del valle Murray (MVE) y con los virus de Usutu, Kunjin, Kokobera, Stratford y Alfuy.

Fue esta reactividad cruzada con los reactivos serológicos de SLE que inicialmente confundió al VON con el de SLE en la Ciudad de New York. Otras pruebas adicionales que usaron exámenes directos de la secuencia genética del virus de NYC lo que lo identificó como VON y no SLE (PAHO, 2001)

Estructura del VON

Los Flavivirus tienen un núcleo icosaédrico de 30 a 35 nm compuesto de múltiples copias de proteínas de cápside de 12-k-Da. La cápside encierra una cadena sencilla, en sentido positivo de RNA de aproximadamente 12,000 nucleótidos. La cápside se encierra en una envoltura derivada de una célula hospedera que ha sido modificada por la inserción de dos glicoproteínas integrales de membrana, E (53kDa) y prM (18-20 kDa). El virion es de 45 a 50 nm de diámetro. En la maduración del virus, la proteína prM es partida en proteína M por una proteasa celular y la proteína M es incorporada en el virion maduro. El genoma también codifica para siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) que arman la maquinaria de replicación intracelular del virus. La glicoproteína E es la proteína inmunológica estructural más importante, es el hemaglutinador viral y media la unión virus-célula hospedera. Todos los flavivirus están cercanamente relacionados antigénicamente lo que ha sido observado en diagnósticos de laboratorio. Los miembros del complejo JE están tan relacionados que se requieren pruebas especializadas (ensayos de neutralización de virus) para determinar cual es el flavivirus (Petersen y Roehrig, 2001).

Aislamiento en Mosquitos del VON

Andreadis, et al., (2001) obtuvieron 14 aislamientos de VON de 4 especies de mosquitos (*Cx. pipiens* (5), *Cx. salinarius* Coquillett(2), *Cx. restuans* (4) y *Cs. melanura* (3)) de Connecticut, en el periodo de Junio a Octubre del 2000. La identificación se realizó por RT-PCR. Analizaron 137,199 mosquitos agrupados en 9,085 grupos de 8 géneros y 32 especies. La mayoría de los aislamientos los obtuvieron en áreas donde hubo grandes densidades de mosquitos, además donde existió una alta tasa de mortalidad en cuervos durante el brote de 1999.y concluyeron que *Cx. restuans* pareció ser el responsable

de la transmisión de VON a las aves durante el inicio del verano, *Cx. pipiens* empezó a tener un papel importante en la amplificación del virus al final de esta temporada, *Cs. melanura* pudo ser importante en la transmisión del VON a nivel de aves silvestres y *Cx. salinarius* pudo haber sido el puente entre humanos y caballos.

Bernard, et al., (2001) buscaron mosquitos infectados en el estado de New York, en el 2000, por medio de RT-PCR (Taq Man) y encontraron el virus en la ciudad de New York y condados de alrededor, analizaron 7,282 grupos de mosquitos, durante la temporada de transmisión, de los cuales 8 especies se detectaron positivas al VON (358 grupos), que se agruparon en cuatro géneros. La tasa de infección mínima para 1,000 mosquitos fue la más alta para *Cx. pipiens* (3.53) en la temporada completa y (7.49), que fue el pico en Agosto. El número de mosquitos analizados fue de 232,131. Los grupos con mayor número de positivos fueron *Cx. pipiens* y *Cx. pipiens/restuans* con 289 grupos.

Kulasekera, et al., (2001) realizaron una vigilancia epidemiológica del VON en Staten Island, New York, en el 2000 y encontraron positivos a VON, a *Ae. vexans*, *Cx. pipiens*, *Cx. salinarius*, *Oc. triseriatus*, *Ps. ferox* y *An. punctipennis* y propusieron un modelo de transmisión que envuelve a *Cx. pipiens* y *Cx. restuans* como vectores primarios enzoóticos y epizoóticos entre aves, *Cx. salinarius* fue el vector puente primario para humanos y para caballos *Aedes/Ochlerotatus*. Se probaron 24,068 mosquitos que se agruparon en 7 géneros y 23 especies de mosquitos (967 grupos), de los cuales 131 fueron positivos al virus.

Nasci, et al., (2001) implementaron un programa de vigilancia para monitorear brotes de VON sobre los mosquitos, en 1999; esto se debió a que empezaron los primeros brotes del VON en América (Área de New York y New Jersey), el programa lo empezaron en las primeras semanas de septiembre de ese año y siguieron hasta el siguiente mes, los mosquitos fueron colectados por medio de trampas de gravidez. Analizaron 32,814 mosquitos, representados en 24 especies y agrupados en 1,853 grupos (*Cx. pipiens*, 511 mosquitos, *Cx. pipiens/restuans* 4,686 y *Cx. restuans*, 215); la identificación del virus la realizaron por medio de la técnica molecular de RT-PCR específico del virus y cultivo de

células Vero y aislaron al virus de 15 grupos de mosquitos colectados, la mayoría de los aislamientos fueron de mosquitos *Cx. pipiens* (6 grupos), *Cx. pipiens/restuans* (7 grupos). Otros de los virus identificados fueron del Subgrupo California, Flanders y EEE.

Yaremych, et al., (2004) monitorearon la prevalencia del VON en mosquitos, en las áreas donde estuvieron capturando cuervos, en la parte este-centro de Illinois, los mosquitos fueron colectados por trampas de luz con CO₂, además de trampas de gravidez; este proyecto se realizó por 15 semanas entre Mayo y Septiembre del 2002; Capturaron 595 grupos de mosquitos (grupos de 1 a 50 especímenes), que se agruparon en 10 especies, pero para el género *Culex*, no lo identificaron a nivel específico; De estos 20 grupos se encontraron positivos a VON, esto, entre mediados de Julio a finales de Septiembre, 18 fueron de hembras y 1 de machos de *Culex* ssp y 1 de *An. punctipennis* (Say). 14 de los grupos los capturaron trampas de gravidez y el resto en trampa de luz con CO₂.

Reisen, et al., (2004) aislaron en California al VON en *Cx. tarsalis* y *Cx. quinquefasciatus*, en el condado Imperial (16 grupos positivos), en Los Angeles, lo aislaron de *Cx. quinquefasciatus* que se colectaron por trampas de gravidez, en septiembre del 2003, por lo que mencionaron que este virus se pudo haber introducido a ese estado, durante Julio del 2003, En *Cx. quinquefasciatus* encontraron 6 grupos positivos de un total de 1, 036 de esa localidad anteriormente mencionada; los mosquitos fueron tamizados para detección de virus por medio de cultivo celular y para detección del virus por medio de Taq Man.

Tesh, et al., (2004) detectaron durante sus estudios de monitoreo del VON, a 400 grupos (28 mosquitos/grupo) de mosquitos positivos a este virus entre Enero del 2003 y Marzo del 2004, en el condado Harris, en Texas; fueron capturados por medio de trampas de luz CDC miniatura y trampas de gravidez; se colectaron y analizaron 372,568 mosquitos y el 95% pertenecieron a *Cx. quinquefasciatus*. Los mosquitos fueron probados para la detección de VON por el inmunoensayo de captura de antígeno (EIA) y confirmados por RT-PCR. Entre Julio y Agosto se colectaron la mayor cantidad de grupos positivos (331), pertenecientes al mosquito mencionado.

Efecto de la Temperatura sobre el VON y otros Arbovirus

Hurlbut, (1973) mencionó que el tiempo de incubación del virus de la Encefalitis San Luis en *Cx. quinquefasciatus*, de San Antonio, Texas, desde la infección hasta la transmisión por medio de la alimentación del mosquito, tuvo una relación con la temperatura y dentro el rango de 20 – 30°C, expresado por la ecuación $(T-17)D=109$, donde T= temperatura y D= Días, similar a esto encontró que el tiempo de digestión de la comida de sangre entre 10 a 30°C, pudo calcularla la ecuación de $(T-5)D=50$. La razón entre los tiempos de incubación del virus y la digestión de sangre, revelan que la temperatura optima es de 30°C, la sobrevivencia de los mosquitos, bajo las condiciones experimentales para completar la incubación también fue optima a esa temperatura anterior, pero es adverso a 37°C, con una humedad relativa asociada de 37%.

Se ha mencionado que la temperatura puede afectar la habilidad de los mosquitos para transmitir arbovirus, sin embargo observaron que estos resultados no son muy palpables entre los virus y las especies de mosquitos, por lo que evaluaron el efecto de la temperatura de incubación en la habilidad de *Cx. pipiens*, colectados durante el brote en New York, 1999, para transmitir VON que obtuvieron de cuervos muertos durante los brotes, los mosquitos se alimentaron de pollos viremicos y la tasa de infección se relaciono directamente con la temperatura de incubación, a 30°C, el virus se recuperó de 98% de los mosquitos probados, la infección diseminada la detectaron a los 4 días post-alimentación y mas del 90% tuvieron la infección a los 12 días de haberse alimentado, En contraste en los mosquitos incubados a 18°C, la diseminación de la infección la detectaron a los 25 días post-alimentación infectiva y a 28 días, menos del 30% tuvieron la infección diseminada; entre 20 - 26°C, fueron los resultados intermedios, por lo que concluyeron que la temperatura ambiental se debe de considerar cuando se evalúa la competencia vectorial de los mosquitos sobre los modelos de riesgo de transmisión del VON en la naturaleza (Dohm, et al., 2001, Dohm, et al., 2002a).

Transmisión Vertical del VON y otros Arbovirus

Shroyer, (1990) colocó a hembras de laboratorio de *Cx. quinquefasciatus* vírgenes con machos infectados del virus de encefalitis de San Luis (SLE), cuando estas hembras fueron probadas para detección del virus después de 7 a 28 días posteriores a la exposición a los machos infectados y encontró que el 23 y el 25%, respectivamente fueron infectadas con este virus, de estas el 58% fueron hembras inseminadas y el 23% fueron hembras vírgenes, esto demostró que hubo transmisión vertical de este virus, además que la transmisión venérea de machos a hembras demostró la horizontal, por lo que concluyó que si se encuentran a machos silvestres infectados verticalmente con SLE, podrían infectar a las hembras.

Dohm, et al., (2002b) mencionaron que a pesar que detectaron el VON en *Cx. pipiens* en invierno (en una tasa pequeña), los mecanismos por los cuales el virus persiste en el invierno y resurge en primavera, con infecciones en hospederos vertebrados y vectores, permanecen desconocidos, por lo que investigaron que puede existir una transmisión vertical, como medio de sobrevivencia viral, por lo que inocularon intratorácicamente a *Cx. pipiens* y *Ae. albopictus* con VON y analizaron la progenie para la presencia del virus; de la primera especie encontraron el virus en 2 de 1,417 mosquitos de la progenie, por lo que la tasa de infección mínima filial (MFIR) es de 1.4/1,000, esto a 18°C; a 26°C, fueron 4 de 1,873 (MFIR= 2.1/1,000), el título promedio del grupo positivo fue de $10^{5.6}$ unidades formadoras de placa/ ml de virus.

Comparación de los Métodos de Detección y Transmisión Experimental del VON

Turell, et al., (2000) evaluaron el potencial de los mosquitos de New York para transmitir el VON, los mosquitos que se colectaron por trampa de luz con CO₂, los inocularon oralmente, dejando que se alimentaran de pollos infectados con VON, que aislaron de un cuervo muerto durante los brotes de 1999; los mosquitos fueron observados dos semanas postalimentación para determinar la infección, diseminación y tasa de transmisión. Encontraron que los mosquitos *Cx. pipiens* fueron susceptibles a la

infección (81%) y de estos la tasa de diseminación fue del 16% y la tasa de transmisión diseminada fue de 86%, los cuales la mayoría pudieron transmitir el virus por medio de su alimentación.

Sardelis, et al., (2001) estudiaron las tasa de infección, diseminación y transmisión para mosquitos expuestos oralmente al VON, entre ellos estuvieron cuatro especies de *Culex* incluyendo a *Cx. quinquefasciatus* y una de *Coquilletidia* de Norte América. Para la especie mencionada de *Culex* probaron 124 mosquitos, la tasa de infección osciló de 50 a 94%, esto en Vero Beach, la tasa de diseminación fue de 5 a 22% y la de transmisión fue de 0 a 20%, por medio de inoculación intratoracica encontraron un 94% de transmisión.

Goddard, et al., (2002) estudiaron la competencia vectorial de varios mosquitos para el VON en California, los mosquitos fueron infectados oralmente por alimentación con gotas de sangre de conejo, con VON del brote de 1999, posteriormente a los 7 y 14 días, inmovilizaron a los mosquitos con trietilamina y colocaron sus probóscide en un capilar, con una solución de sucrosa y FBS y encontraron que todos los mosquitos fueron susceptibles a la infección, Las tasa de infección de las especies de *Culex* y *Cs. inornata* que probaron a los 14 días, se encontraron con altas dosis de virus que oscilan de 58 a 100%, menos *Cx. quinquefasciatus* de Coachella Valley que fue menor al 15%; para la transmisión del virus el mas eficiente que encontraron fue *Cx. tarsalis* con 60% de transmisión, seguido por *Cx. quinquefasciatus* de Bakersfield con 52%. La misma especie de Coachella Valley, se encontró con transmisión de <6%, por lo que se consideró un vector pobre para VON.

Nasci, et al., 2002 compararon el ensayo de placa de células Vero, Taq Man[®] que es la reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa y el ensayo antigénico Vec Test[™] para la detección del ARN viral del VON en mosquitos colectados en campo, colectados en Staten Island, durante la epidemia de VON en el 2000, los identificaron a especies y los agruparon en grupos de 50 individuos, en total probaron 10,866 especímenes, agrupados en 801 grupos y concluyeron que el ensayo de placa detectó el 74% de los grupos positivos por Taq Man RT-PCR y el Vec Test detectó evidencia del antígeno viral

en 60% de los positivos por Taq Man, además Vec Test detectó el 67% de los grupos que contenían virus vivo detectado en el ensayo de placa.

MATERIAL Y METODO

Descripción del Área de Estudio

El área donde se realizó el estudio fue en dos municipios del área Metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México y en un municipio conurbano. Los dos primeros son Guadalupe y Escobedo y el último Pesquería.

En las ciudades de Guadalupe (25° 44' N y 100° 16' O) y Escobedo (27° 14' N y 101° 24' O). El clima de esta región puede ser descrito como cálido y semihúmedo, con precipitación limitada, excepto por tormentas fuertes ocasionales. La precipitación promedio anual es de 600 mm y la temperatura promedio anual es de 28° C. Las elevaciones sobre el nivel del mar oscilan entre 450–530 metros. La población de Guadalupe es de 670,162 habitantes y en Escobedo es 233,455. Esto dos municipios presentan áreas urbanas y suburbanas. Los ríos Pesquería y Santa Catarina se encuentran cerca de las áreas de estudio, en las dos ciudades respectivamente.

El otro municipio conurbano es Pesquería, el cual se encuentra localizado a 30 kilómetros al noreste de la ciudad de Monterrey, en el estado de Nuevo León, México (25° 47' N y 100° 03' W) y tiene 11,321 habitantes. Este lugar se encuentra en un área suburbana cercana a cultivos de cereales (maíz, trigo, cebada y avena), se encuentra a 400 metros sobre el nivel del mar. El río Pesquería atraviesa esta región y el área de estudio se encuentra localizada en donde los asentamientos humanos se encuentran establecidos a lo largo del río. La vegetación se encuentra representada por matorral submontano y es una planicie (valle aluvial). El promedio de precipitación anual es de 550 mm. El promedio mensual de precipitación durante la temporada de sequía es de 40 mm y es de Junio a Agosto. La temperatura promedio anual es de 28° centígrados. La humedad se mantiene entre 40 y 60%, en la noche prevalecen vientos de menos de 1.15 Km./ h.

Colecta de Mosquitos

Los mosquitos fueron colectados durante el periodo de Junio del 2003 a Septiembre del 2004. Empleando las siguientes técnicas de colecta mencionadas: Trampas de luz CDC miniatura de luz clara y negra mas dióxido de carbono (CO₂) (Foto 4), aspirado por medio de un aspirador de espalda motorizado, para colectas intradomiciliares (Foto 2), peridomiciliares y en vegetación (Foto 1 y 3), colecta de estadios inmaduros con emergencia en laboratorio (Demostrar posible transmisión transovarica) y cebo humano con aspirador bucal o de baterías (Foto 5 y 6). Después de la colecta, los mosquitos se transportaron en contenedores con hielo seco (CO₂) al laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas, U. A. N. L., donde se separaron en grupos de mosquitos de 10 individuos (pool), separándose en especies, sexo, fecha y método de colecta, esto se realizó sobre una mesa fría y bajo observación del estereoscopio. Posteriormente los mosquitos se almacenaron en un ultracongelador (-70 °C) y se transportaron en contenedores con hielo seco a University of Texas Medical Branch (UTMB), para ser procesados para el aislamiento del virus.

Aislamiento del Virus

Los grupos de mosquitos de 10 individuos fueron triturados manualmente, en 1 ml de solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS, pH 7.4), que contenía 30% de suero fetal de bovino y antibióticos (penicilina, estreptomycin y anfotericina). La suspensión resultante se centrifugó a 12, 000 rpm por 5 minutos; entonces 200 µl del sobrenadante se inoculó adentro de un frasco de cultivo de una monocapa de células Vero. Después de 1 hora de absorción a 37 °C, se le añadió el medio de mantenimiento; el cultivo se mantuvo en una incubadora a 37 °C y 5% de CO₂ y se revisó diariamente para buscar evidencia del efecto citopático (CPE).

Si se observó el efecto citopático en las células Vero, se realizaron pruebas de inmunofluorescencia indirecta, prueba de la inhibición de la hemaglutinación (HI), el ensayo antigenico Vec Test WNV/SLE (Medical Analysis Systems, Camarillo, CA) y

transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa. Se tituló el virus por medio del método de Overlay.

La prueba inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la detección de antígenos para VON consistió en el uso de laminillas, que se prepararon obteniendo 15 μ l de las células del frasco y se depositaron en los pozos de la laminilla y se dejaron secar dentro de un gabinete de bioseguridad con flujo laminar, posteriormente se fijaron con acetona; las laminillas se titularon, utilizando PBS + PS y se hicieron las diluciones (10–320), las cuales se colocaron en los pozos y se incubaron por 1 hora a 37°C, posteriormente siguieron 2 lavados y se agregó 20 μ l del conjugado y se incubaron en una cámara húmeda por 1 hora, donde se secaron en una incubadora y se procedió a realizar la observación.

Los anticuerpos a VON se midieron por la inhibición de la hemaglutinación, los antígenos para esta prueba se prepararon de cerebros de ratones recién nacidos infectados con la una cepa de VON y se extrajo por el método de sucrosa-acetato.

El ensayo antigenico Vec Test WNV/SLE se empleó para detectar el antígeno del virus del Oeste del Nilo en los grupos de mosquitos. Esta prueba es una inmunocromatografía cualitativa que utiliza anticuerpos monoclonales específicos que detectan el antígeno del VON o ESL. Los cultivos con efecto citopático se probaron, añadiendo 100 μ l del cultivo en un tubo cónico, se le agregó 100 μ l de la solución de triturado incluida en el conjunto. La tira de prueba se colocó en el tubo y la mezcla migró a la tira, el antígeno viral si se encuentra presente, reaccionó con los anticuerpos monoclonales conjugados, que contiene la tira. El complejo antígeno- anticuerpo migró a la zona de prueba que contiene sustancias fijadoras para este complejo y se acumuló hasta formar una línea roja visible.

El ARN viral se extrajo del cultivo monocapa de células Vero infectado, obteniendo 140 μ l del sobrenadante de este cultivo, empleando el conjunto de extracción de ARN viral QiaAMP (QIAGEN Inc., Valencia, CA), El ARN se extrajo de la columna QIAGEN, en un volumen final de 100ml de solución amortiguadora de elución y se almacenó en un

ultracongelador a -70°C , hasta su uso. $5\ \mu$ del ARN se combinaron con tres pares de iniciadores (primers) en orden de amplificar los genes prM-E y axial utilizar el conjunto Taq Man RT-PCR ready mix (PE Applied Biosystem, Foster City, CA). Las muestras pasaron por 45 ciclos de amplificación.

El método de Overlay para la titulación de un virus, utilizó placas de 24 pozos, en los cuales se hicieron las diluciones del virus, al tubo primero se le añadió $50\ \mu\text{l}$ de la muestra en $450\ \text{ml}$ de PBS- PS+ FBS. Se añadieron posteriormente la soluciones de Overlay, que el primero requiere mezclar agua y agar noble en un bote y en otro mezclar ojo rojo, bicarbonato y Dextran, posteriormente se pusieron a hervir y a 40°C , se mezclan y se le aplicó $1\ \text{ml}$ a cada pozo y se le adicionó $0.8\ \text{ml}$ de solución cornwall y se incubó a 37°C y se observó al tercer día y se le cambia la solución de Overlay 2, que lleva además rojo neutro.

RESULTADOS

Colecta de Mosquitos

Un total de 238 grupos (pools) de mosquitos se colectaron durante el periodo del estudio, el cebo humano fue el método de colecta, por el cual se colectaron mas especimenes (40.3%), seguido del aspirado intradomiciliar (23.1%) y las trampas de luz con dióxido de carbono (21.8%); del total de culícidos capturados el 61.8% fueron hembras y el 38.2% machos (Tabla 1).

Del total de especimenes colectados el 35.3% fueron *Cx. quinquefasciatus*, de los cuales las trampas de luz y el aspirado en vegetación resultaron con casi el 16% de los mosquitos capturados totalmente, por cebo humano solo se obtuvo el 6.7%; el 51.2% de los *Cx. quinquefasciatus* fueron hembras y el 48.8% machos (Tabla 2)

Las especies de culícidos que se colectaron en los tres municipios fueron *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*; en Guadalupe y Escobedo, *Cx. coronador* Dyar y Knab, *Ps. Ferox* (Von Humboldt), *Ps. cyanescens* (Coquillett) y *Ps. ciliata* (Fabricius); y los mosquitos que solamente se encontraron en Pesquería fueron, *Ae. vexans* (Meigen), *Oc. taeniorhynchus* (Wiedemann), *Ps. confinnis* (Lynch Arribalzaga) y dos especies de *Anopheles*. (Tabla 3).

En total se colectaron 2,297 mosquitos, representados en 4 géneros y 11 especies y se agruparon en los 238 grupos ya mencionados. La especie mas colectada fue *Cx. quinquefasciatus* con 82 grupos de mosquitos (798 ejemplares), seguido de *Ps. ferox* con 70 con grupos, con 697 especimenes y en tercer lugar se encuentra *Ae. aegypti* con 40 grupos (399 especimenes), las especies que solo tuvieron un grupo fueron *Ae. vexans*, *An. pseudopunctipennis* y *An. quadrimaculatus* Macquart, siendo esta última, en la que solo se consiguieron 2 especimenes (Tabla 4).

Solamente de un grupo de mosquitos se aisló el Virus del Oeste del Nilo, este perteneció a *Cx. quinquefasciatus* (10 especímenes hembras), colectados el 10 de Junio del 2003, en el Ejido Francisco Villa, Pesquería, N. L., México y fue colectado por aspirado en vegetación, se identificó por medio de inmunofluorescencia, la prueba de inhibición de la hemaglutinación, el ensayo antigenico Vec Test y RT-PCR y se tituló por el método de Overlay y por este método resulto con 10^2 unidades formadoras de placa / mililitro.

DISCUSIONES

De los 238 grupos de mosquitos capturados, el método de colecta con mayor porcentaje de capturas fue el cebo humano (40.3%), seguido por el aspirado intradomiciliar (23.1%), después la trampa de luz CDC miniatura (luz blanca y oscura) (21.8%), en cuarto lugar el aspirado en vegetación (casi 8%) y por último los mosquitos que emergieron en laboratorio (6.7%)(Tabla 1), pero el método de colecta que se utiliza preferentemente es la trampa de gravidez y las trampas de luz CDC con CO₂ (Nasci , et al., 2001, Reisen , et al., 2004, Tesh, et al., 2004 yaremych, et al., 2004); de los mosquitos colectados, solo se colectó a un grupo de mosquitos positivos al VON (*Cx. quinquefasciatus*), colectados por medio del aspirado en vegetación en una localidad de Pesquería. Al no encontrarse positivos los mosquitos que se colectaron en etapas inmaduras y que emergieron en laboratorio (los de menor porcentaje colectados), no fue posible demostrar la transmisión transovarica (vertical) del virus, pero la transmisión vertical, de este virus ha sido detectada en New York experimentalmente, en una tasa baja (0.14%) por Dohm, et al., (2002), si consideramos este resultado y los mosquitos capturados en las colectas en Nuevo León (2297, enlistados en 238 grupos), solo podríamos encontrar a 3 mosquitos positivos al VON verticalmente. Por otro lado, el 38.2% de los mosquitos totales fueron machos (Tabla 1), pero también fueron negativos al virus, por lo que no se demuestra la posibilidad de transmisión por medio de inseminación (transmisión venérea) como lo ha demostrado Shroyer, (1990) que colocó a hembras de laboratorio de *Cx. quinquefasciatus* vírgenes con machos infectados del virus de encefalitis de San Luis (SLE) y encontró que entre 23 y 25% fueron infectadas con este virus, de estas el 58% fueron hembras inseminadas y el 23% fueron hembras vírgenes, lo que demostró que hubo transmisión vertical de este virus, además de transmisión venérea de machos a hembras.

Del total de mosquitos, la especie que tuvo el mayor porcentaje de representación fue *Cx. quinquefasciatus* (34.4%), seguido por *Ps. ferox* (29.4%), posteriormente *Ae. aegypti* (16.38%), los siguientes fueron *Oc. taeniorhynchus* y *Cx. coronator* con un 11.76% entre ambos, los que tuvieron menos de 10 grupos de mosquitos fueron *Ps. cyanescens*, *Ps. ciliata*, *Ps. confinnis*, *Ae. vexans*, *An. pseudopunctipennis* y *An.*

quadrifasciatus, entre todos con una representación del 7.9% (Tabla 4), pero solo se encontró positiva al VON a la especie ya mencionada (*Cx. quinquefasciatus*), también la encontraron positiva en Texas (Tesh, et al., 2004) y en California (Reisen, et al., 2004); no se encontraron positivas a otras especies como lo reportaron (Andreadis, et al., 2001, Kulasekera, et al., 2001 yaremich, et al., 2004, Tesh, et al., 2004), posiblemente porque el número de especímenes colectados fue reducido en comparación a los reportados por los autores anteriores.

Por otro lado, el grupo de *Cx. quinquefasciatus* positivo al VON, no perteneció, a los municipios del área metropolitana de Monterrey (urbanos), sino a uno suburbano, que colinda con los municipios urbanos, como lo es Pesquería (30 Km. de Monterrey) (Tabla 3).

Las pruebas que se realizaron para detección del VON fueron la inmunofluorescencia indirecta, prueba de la inhibición de la hemaglutinación (HI), el ensayo antigénico Vec Test WNV/SLE (Medical Analysis Systems, Camarillo, CA) y transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa. Y en todos se encontró positivo, aunque Nasci, et al., (2002) concluyeron en su estudio que el ensayo de placa detectó el 74% de los grupos positivos por Taq Man RT-PCR y el Vec Test detectó evidencia del antígeno viral en 60% de los positivos por Taq Man, además Vec Test detectó el 67% de los grupos que contenían virus vivo detectado en el ensayo de placa. La titulación se realizó por el método de Overlay y el resultado que dio fue de 10^2 unidades formadoras de placa / mililitro, que fue menor a la reportada por Dohm, et al., (2002) en laboratorio, que fue de $10^{5.6}$ unidades formadoras de placa / mililitro.

Considerando que se encontró a 1 (0.42%) grupo de mosquitos hembras de *Cx. quinquefasciatus*, positivo al VON esto podría convertirlo en un vector puente potencial importante del Virus del Oeste del Nilo en México; el porcentaje de positividad solo fue mayor al reportado por Andreadis, et al., (2001) que encontraron el 0.15% de positividad en Connecticut, evaluando 9,085 grupos (137,199 mosquitos); Nasci, et al., (2001) reportaron el 0.8% de positividad en New York y New Jersey, de 1, 853 grupos (32,814 mosquitos);

Yaremych, et al., (2004) encontraron de positividad el (3.36%) en Illinois, pero no separaron las especies de *Culex*; el porcentaje mas alto lo reportaron Kulasekera, et al., (2001) y fue de 13.54% de 967 grupos (24,068 mosquitos) en New York. Los investigadores que colectaron a *Cx. quinquefasciatus*, fueron Tesh, et al., (2004) que encontró el 3% de positividad en Texas, lo que es 400 grupos con VON de 13,306 grupos (> 350,000mosquitos) de los cuales mas del 95% fueron esta especie y Reisen, et al., (2004) que encontraron una positividad del 1.54% (16 grupos de 1,036 grupos y de los positivos 6 fueron de *Cx. quinquefasciatus*. Por otro lado cabe mencionar que faltan realizarse mas estudios para incriminar a este mosquito como vector en México, entre ellos estudios de laboratorio, por ejemplo calcular la tasa de infección, diseminación y transmisión del VON para mosquitos ya sea expuestos oralmente o por inoculación intratoracica, como los realizados por Turell, et al., (2000), Sardelis, et al., (2001), Goddard, et al., (2002).

CONCLUSIONES

El método de colecta con mayor porcentaje de capturas fue el cebo humano (40.3%), seguido por el aspirado intradomiciliar (23.1%), después la trampa de luz CDC miniatura (luz blanca y oscura) (21.8%), en cuarto lugar el aspirado en vegetación (8%) (Tabla 1), por este último se encontró positivo al VON un grupo de mosquitos del municipio de Pesquería, Nuevo León, área suburbana, que colinda con los municipios metropolitanos de Monterrey, en Junio del 2003.

Las pruebas que se realizaron para detección del VON fueron la inmunofluorescencia indirecta, prueba de la inhibición de la hemaglutinación (HI), el ensayo antigénico Vec Test WNV/SLE (Medical Analysis Systems, Camarillo, CA) y transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa. Y en todos estos ensayos el grupo de mosquitos resultó positivo a este virus. La titulación se realizó por el método de Overlay y el resultado que dio fue de 10^2 unidades formadoras de placa / mililitro.

Al no encontrar positivos al VON a mosquitos que emergieron en laboratorio, ni a machos, no se determinó la transmisión transovarica, ni la posibilidad de transmisión venérea.

Las especies que tuvieron el mayor porcentaje de representación fue *Cx. quinquefasciatus* (34.4%), seguido por *Ps. ferox* (29.4%), *Ae. aegypti* (16.38%), los siguientes fueron *Oc. taeniorhynchus* y *Cx. coronator* (11.76% entre ambos), pero solo la primera resultó positiva al VON.

Considerando que se encontró a positivo a VON a 1 (0.42%) grupo de mosquitos hembras de *Cx. quinquefasciatus*, esto podría convertirlo en un vector puente potencial importante del Virus del Oeste del Nilo en el noreste de México.

REFERENCIAS CITADAS

- Andreadis, T. G., J. F. Anderson, & C. R. Vossbrinck. 2001. Mosquito surveillance for West Nile virus in Connecticut, 2000: isolation from *Culex pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarius* and *Culiseta melanura*. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (4): 670- 674.
- Bernard, K. A., J. G. Maffei, S. A. Jones, E. B. Kauffman, G. D. Ebel, A. P. Dupuis II, K. A. Ngo, D. C. Nicholas, D. M. Young, P. Y. Shi, V. L. Kulasekera, M. Eidson, D. J. White, W. B. Stone, NY State West Nile virus surveillance team and L. D. Kramer. 2001. West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York state, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (4): 679- 685
- Blitvich, B. J., I. Fernández- Salas, J. F. Contreras-Cordero, N. L. Marlenee, J. I. González-Rojas, N. Komar, et al 2003. Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Horses, Coahuila State, México. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (7): 853-856.
- Blitvich, B. J., I. Fernández- Salas, J. F. Contreras-Cordero, M. A. Lorono-Pino, N. L. Marlenee, F.J. Díaz, J. I. González-Rojas, N. Obregón-Martinez, J. A. Chiu-García, W. C. Black IV & B. J. Beaty. 2004. Phylogenetic Analysis of West Nile Virus, Nuevo León State, México. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 1314-1317.
- Campbell, G. L., A. A. Marfin, R. S. Lanciotti, D. J. Gubler. 2002 West Nile virus. *Lancet Infect Dis.* 2:519-29.
- Dohm, D. J., & M. J. Turell. 2001. Effect of incubation at overwintering temperatures on the replication of West Nile virus in New York *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. med. Entomol.* 38(3): 462-464.
- Dohm, D. J., M. L. O'guinn, & M. J. Turell. 2002a. Effect of environmental temperatura on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *J. Med.*

Entomol. 39 (1): 221-225.

Dohm, D. J., M. R. Sardelis, & M. J. Turell. 2002b. Experimental vertical transmisión of West Nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 39 (4): 640-644.

Fernández- Salas, I., J. F. Contreras-Cordero, B. Blitvich, J. I. González-Rojas, A. Cavazos-Álvarez, N. L. Marlenee, A. Elizondo-Quiroga, M. A. Lorono-Pino, D. J. Gubler, B. C. Cropp, C. H. Calisher & B. J. Beaty. 2003. Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Birds, Tamaulipas State, México. Vector Borne Zoonotic Dis. 3: 209-213.

Goddard, L. B., A. E. Roth, W. K. Reisen & T. W. Scott. 2002. Vector Competence of California Mosquitoes for West Nile Virus. Emerg. Infect. Dis. 12: 1385-1391.

Hurlbut, H. S. 1973. The effect of environmental temperature upon the transmission of St. Louis encephalitis virus by *Culex pipiens quinquefasciatus*. J. med. Entomol. 10 (1): 1-12.

Kulasekera, V. L., L. Kramer, R. S. Nasci, F. Mostashari, B. Cherry, S. C. Trock, C. Glaser and J. R. Miller. 2001. West nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. Emerg. Infect. Dis. 7(4): 722-725.

Komar, N. 2003. West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. Adv Virus Res. 61:185-234.

Nasci, R. S., D. J. White, H. Stirling, J. Oliver, T. J. Daniels, R. C. Falco, S. Campbell, W. J. Crans, H. M. Savage, R. S. Lanciotti, C. G. Moore, M. S. Godsey, K. L. Gottfried, & C. J. Mitchell. 2001. West Nile virus isolates from mosquitoes in New York and New Jersey, 1999. Emerg. Infect. Dis. 7(4): 626-630.

-
- Nasci, R. S., K. L. Gottfried, K. L. Burkhalter, V. L. Kulasekera, A. J. Lambert, R. S. Lanciotti, A. R. Hunt, & J. R. Ryan. 2002. Comparison of vero cell plaque assay, Taq Man[®], reverse transcriptase polymerase chain reaction RNA assay, and Vectest[™], antigen assay for detection of West Nile virus in field-collected mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 18 (4): 294-300.
- PAHO. 2001. Virus del Nilo Occidental en las Américas 2001 (En Línea) Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/sha/be-v2In4-nilo.htm> (2002, Enero, 10)
- Petersen, L. R., & J. T. Roehrig. 2001. West Nile virus: A reemerging global Pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 7(4): 611-614.
- Rappole, J. H, S. R. Derrickson, & Z. Hubalek. 2000. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis.* 6:319-28.
- Reisen, W. K., H. Lothrop, R. Chiles, M. Madon, C. Cossen, L. Woods, S. Husted, V. Kramer & J. Edman. 2004. West Nile Virus in California. *Emerg. Infect. Dis.* 10(8): 1369- 1377.
- Sardelis, M. R., M. J. Turell, D. J. Dohm, and M. L. O'Guinn. 2001. Vector competence of selected North American *Culex* and *Coquilletidia* mosquitoes for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (6): 1018- 1022.
- Shroyer, D. A. 1990. Venereal Transmission of St. Louis Encephalitis virus by *Culex quinquefasciatus* males (Diptera: Culicidae). *J. med. Entomol.* 27 (3): 334- 337.
- Tesh, R. B., R. Parson, M. Siirin, Y. Randle, C. Sargent, H. Guzman, T. Wuithiranyagool, S. Higgs, D. L. Vanladingham, A. A. Bala, K. Haas, and B. Zerinque. 2004. Year-round West Nile virus activity, Gulf coast region, Texas and Louisiana. *Emerg. infect.*

Dis. 10 (9): 1649-1652.

Turell, M. J., M. O'Guinn & J. Oliver. 2000. Potential of New York Mosquitoes to Transmit West Nile Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 413- 414.

Yaremych, S. A., R. E. Warner, P. C. Mankin, J. D. Brawn, A. Raim, and R. Novak. 2004. West Nile virus and high deathrate in American crow. *Emerg. Infect. Dis.* 10(4): 709-711.

Tabla 1. Mosquitos Culícidos capturados por los diferentes métodos de captura. La colecta se realizó en los Municipios de Guadalupe, Escobedo y Pesquería, N. L., México, durante el periodo de Junio 2003-Septiembre 2004. Los datos se presentan como numero de capturados y porcentaje de capturados.

Método de Colecta	No. de grupos capturados¹ (%)
Trampa de Luz	52 (21.8%)
Cebo Humano	96 (40.3%)
Aspirado en Vegetación	19 (07.9%)
Aspirado Intradomiciliar	55 (23.1%)
Emergencia en Laboratorio	16 (06.7%)
Total	238 grupos de mosquitos

¹Grupo de mosquitos (pool) de 10 especímenes.

²Porcentaje Hembra/ Macho:61.7%(147)/38.2% (91) del total de culícidos capturados.

Tabla 2. Mosquitos *Cx. quinquefasciatus* capturados por los diferentes métodos de captura. La colecta se realizó en los Municipios de Guadalupe, Escobedo y Pesquería, N. L., México, durante el periodo de Junio 2003-Septiembre 2004. Los datos se presentan como numero de capturados y porcentaje de capturados totales n= 238.

Método de Colecta	No. de grupos capturados¹ (%)
Trampa de Luz	19 (07.9%)
Cebo Humano	16 (06.7%)
Aspirado en Vegetación	19 (07.9%)
Aspirado Intradomiciliar	19 (07.9%)
Emergencia en Laboratorio	09 (03.8%)
Total	82 (35.3%) grupos de mosquitos

¹Grupo de mosquitos (pool) de 10 especímenes.

²Porcentaje Hembra/ Macho: 51.2%(42)/49.8%(38) del total de *Cx. quinquefasciatus*.

Tabla 3. Especies de mosquitos capturados en los Municipios de Guadalupe, Escobedo y Pesquería, N. L., México, durante el periodo de Junio 2003-Septiembre 2004. Los datos se presentan como especies capturadas.

Municipio	Especies
Escobedo	<i>Cx. quinquefasciatus</i> y <i>Ae. aegypti</i> .
Guadalupe	<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Cx. coronator</i> , <i>Ps. ferox</i> , <i>Ps. cyanescens</i> , <i>Ps. ciliata</i> y <i>Ae. aegypti</i> .
Pesquería	<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Cx. coronator</i> , <i>Ps. ferox</i> , <i>Ps. confinnis</i> , <i>Ps. cyanescens</i> , <i>Ps. ciliata</i> , <i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. vexans</i> , <i>Oc. taeniorhynchus</i> , <i>An. pseudopunctipennis</i> y <i>An. quadrimaculatus</i> .

Tabla 4. Resumen de los mosquitos colectados en los Municipios de Guadalupe, Escobedo y Pesquería, N. L., México, durante Junio del 2003-Septiembre 2004, que fueron analizados para la detección del VON.

Género y especie	No. de grupos (pool)	No. de mosquitos
<i>Ae. aegypti</i>	39	399
<i>Ae. vexans</i>	01	010
<i>Oc. taeniorhynchus</i>	15	146
<i>An. pseudopunctipennis</i>	01	008
<i>An. quadrimaculatus</i>	01	002
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	82	798
<i>Cx. coronator</i>	13	118
<i>Ps. ciliata</i>	05	022
<i>Ps. confinnis</i>	02	008
<i>Ps. cyanescens</i>	09	089
<i>Ps. ferox</i>	70	697
Total	238	2297



Foto 1. Aspirado de Vegetación.



Foto 2. Colecta Intradomicilio

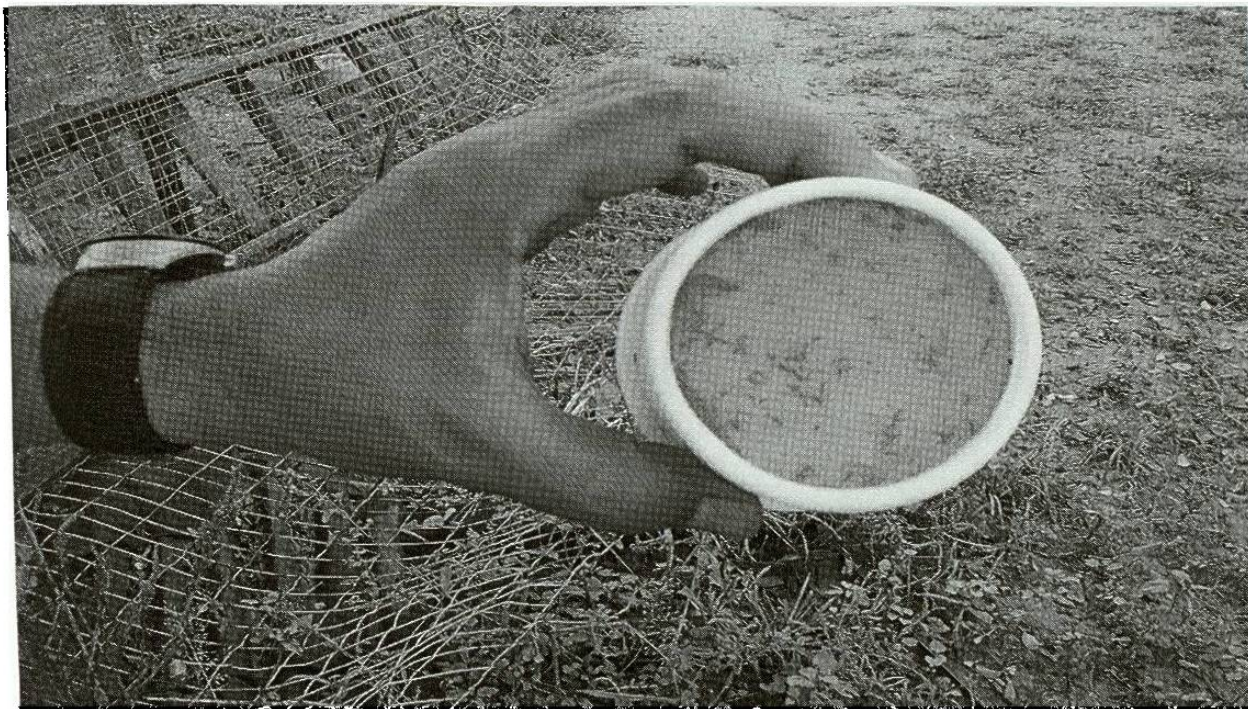


Foto 3. Contenedor de plástico del aspirador motorizado de espalda.

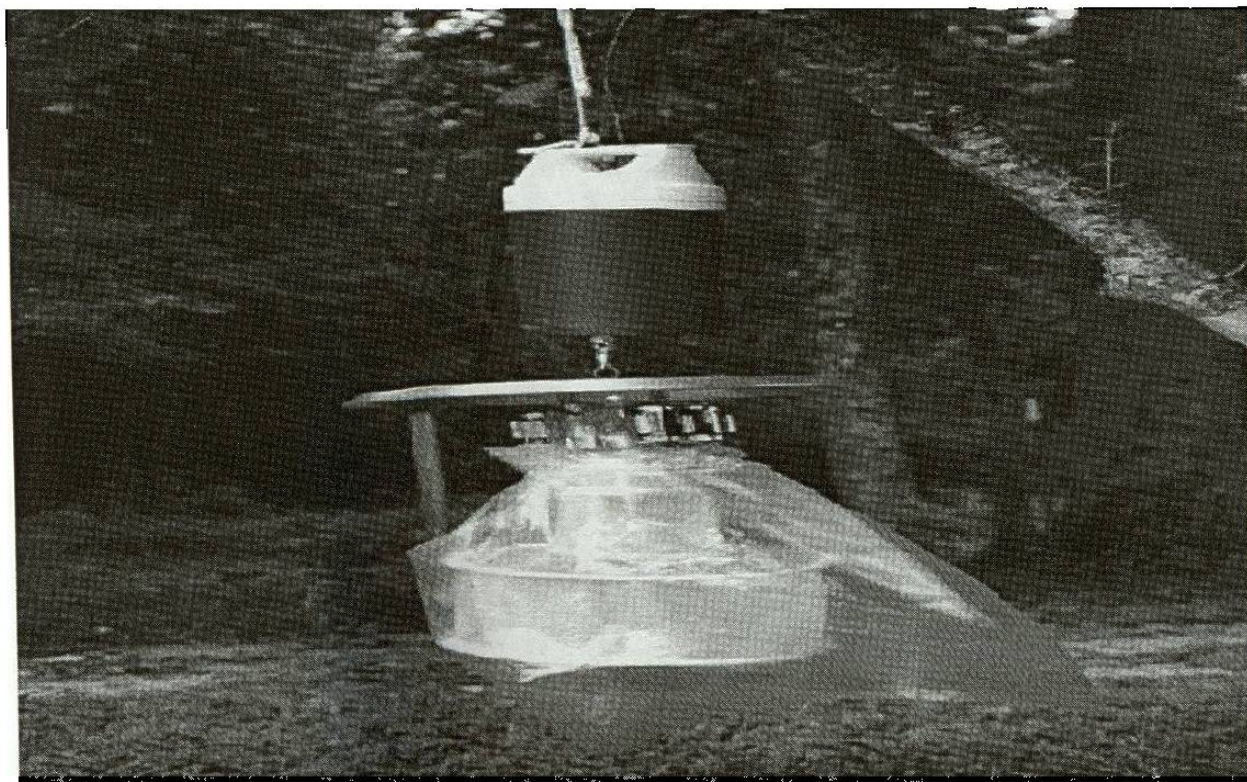


Foto 4. Trampa de luz CDC con termo con CO₂.



Foto 5. Cebo humano con aspirador de baterías



Foto 6. Cebo humano con aspirador bucal

