

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA**



**DETERMINACIÓN DE VIRUS DEL OESTE DEL NILO (VON)
EN LOS AÑOS 2006 Y 2007 EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN,
MÉXICO**

Por

M.V.Z LUIS ARTURO IBARRA JUAREZ

Tesis

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA
MÉDICA.**

Febrero de 2010

**DETERMINACIÓN DE VIRUS DEL OESTE DEL NILO (VON)
EN LOS AÑOS 2006 Y 2007 EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN,
MÉXICO**

COMITE DE TESIS

**Ildefonso Fernández Salas, Ph. D.
PRESIDENTE**

**Dr. Roberto Mercado Hernández.
SECRETARIO**

**Dr. Raúl Torres Zapata.
VOCAL**

**Dr. Feliciano Segovia Salinas
VOCAL**

**Dra. María de La Paz Tijerina Garza
VOCAL**

DEDICATORIAS

A Dios:

Por haberme dado la vida, los mejores padres del mundo y amigos que gracias a ellos he logrado atravesar cada obstáculo que he atravesado en la vida y por los cuales he logrado madurar.

A Mis Padres:

José Ángel Ibarra Mejía

Elvia Juárez Robledo

Quienes siempre han estado atrás de mí apoyándome en cada una de mis decisiones, me han brindado amor, cariño y comprensión, y sobre todo no perdieron la fe en mí. De igual manera les doy gracias por todos los desvelos que han tenido pensando en mi bien, a ellos mi amor y gratitud infinita.

A mi Hermano:

José Ángel Ibarra Juárez

Por cada unos de los momentos que pasamos en nuestra infancia, porque siempre he contado con su apoyo y que gracias a él no deje pasar la excepcional oportunidad de estar acá.

A mi novia

Virginia Aguayo moreno

Por haber llegado a mi vida en el momento justo y haberme devuelto tantas ilusiones, gracias por todo tu apoyo y amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo para la realización de mis estudios de Doctorado con especialidad en Entomología Médica (Becario No. 195778)

A la universidad de Colorado (Colorado State University) y miembros que pertenecen a ella Lars Eisen, Bethany Bolling, por el gran apoyo que me otorgaron para la realización de gran parte de esta investigación

A los integrantes de mi comité de Tesis por las observaciones y apoyo en la realización de este manuscrito.

Al Ph.D. Ildefonso Fernández Salas, por el apoyo desinteresado que me ha otorgado desde el inicio del posgrado en la UANL, por el apoyo para la realización del presente trabajo de Tesis y principalmente por la amistad y consejos que me ha brindado en todos estos años.

A la Q.B. P. Rosa María Sánchez Casas, por su valiosa amistad y apoyo desde que llegué a esta ciudad, gracias por considerarme como un gran amigo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Entomología Médica, Yuri Olivier Ayala Sulca, Pedro Mis Ávila, Marco Domínguez Galera, Darwin Elizondo Quiroga, Artemio Barragán Gómez, Armando Elizondo Quiroga, Antonio Juan Cortés Guzmán, Aldo Iván Ortega Morales, Quetzali Karmi Siller, Alberto Margarito García Munguía, Oscar Loaiza y quienes omito por falta de memoria, unos con mayor tiempo de conocerlos que otros, por todo el apoyo que siempre me han otorgado en momentos importantes en mi vida y por la valiosa amistad que es algo que siempre tendré en mi memoria.

A mis amigos de la infancia y quienes considero como si fueran de mi familia, Maribel Espinosa López, Eric Emmanuel Medina Carranza, Alejandro Enrique Gutiérrez Méndez, Joshuey Reynaldo Hernández Pechá, Francisco Javier Zavala Zavala, Emeterio Vázquez Meza.

A todos los integrantes de las familias Ibarra y Juárez quienes han son importantes en mi vida y que han formado gran parte de mis vivencias.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2.- HIPOTESIS.....	3
3.- OBJETIVOS.....	4
4.- ANTECEDENTES.....	5
4.1.- Área de Estudio.....	5
4.1.1.- Monterrey y área metropolitana.....	5
4.1.2.- Región periférica.....	6
4.1.3.- Región norte.....	6
4.1.4.- Citrícola.....	6
4.1.5.- Sur.....	7
4.2.- Virus del Oeste del Nilo (VON) (Descripción).....	7
4.3.- Distribución de VON.....	9
4.4.- Introducción de VON en América.....	10
4.5.- Epidemiología.....	11
4.6.- Estructura de VON.....	13
4.7.- Métodos de diagnóstico.....	14
4.8 Migración de aves y dispersión de VON.....	16
4.8.1 Rutas migratorias.....	18
4.9.- Epidemias de VON.....	18
4.10.- VON en Equinos.....	20
4.10.1 Epizootias en equinos.....	23
4.11.- Vigilancia epidemiológica de VON en equinos.....	23
4.12.- Equinos como huéspedes terminales.....	25
4.13.- Impacto económico de VON en equinos.....	25

4.14- Prueba de ELISA.....	27
4.15.- Aislamiento y monitoreo de VON en mosquitos.....	27
4.16.- Transmisión vertical de VON y otros arbovirus.....	30
4.17.- Comparación de los métodos de detección y transmisión experimental de VON.....	30
4.18.- Cambio climático y las enfermedades transmitidas por vector.....	32
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
5.1.- Área de estudio.....	36
5.2.- Muestreos en caballos.....	37
5.2.1.- Toma de muestras.....	37
5.3.- Manejo de muestras.....	37
5.4.- Técnica de ELISA de bloqueo.....	37
5.4.1.- Análisis de OD.....	39
5.5.- Colecta de mosquitos.....	40
5.6.- RT-PCR y secuenciación.....	41
5.7.- Identificación de Cx. por vía molecular.....	42
6.- RESULTADOS.....	43
6.1.- Muestreo en caballos.....	43
6.2.- Seropositividad en caballos.....	44
6.3.- Análisis de datos.....	49
6.4.- Colecta de mosquitos.....	52
6.4.1.- Mosquitos positivos.....	53
6.4.2.- Identificación de Cx. por PCR.....	56
7.- DISCUSIÓN.....	57
8.- CONCLUSIONES.....	60
9.- LITERATURA CITADA.....	62

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ciclo del Virus del Oeste del Nilo. Adaptado de Eldridge & Edman.....	8
Fig. 2 Signología de VON en equinos (Patas cruzadas) (Foto: Juan Lubroth, USDA).....	22
Fig. 3 Signología de VON en equinos (Patas abiertas) (Foto: Juan Lubroth, USDA)...	22
Fig. 4. Localización del área de estudio.....	36
Fig. 5. Placa de la prueba de ELISA, el color verde es negativo.....	39
Fig. 6.- Trampa de luz CDC, utilizando CO ₂ en pellets como atrayente.....	40
Fig. 7.- Mosquitos siendo separados mediante el uso de una plancha fría.....	41
Fig. 8.- Seroprevalencia de equinos en el estado de Nuevo León en los años 2006 y 2007.....	44
Fig. 9. Seroprevalencia de VON en los municipios de Villa Juárez, Cadereyta, Pesquería y Montemorelos en el año 2006.....	45
Fig. 10 Seroprevalencias de VON en equinos dependiendo el sexo en el año 2006.....	46
Fig. 11.- Seroprevalencia de VON en equinos en el año 2006 de acuerdo a la edad.....	46
Fig. 12.- Seroprevalencia de VON en equinos en los municipios de Monterrey, Cadereyta, Santiago y Pesquería en el año 2007.....	47
Fig. 13.- Seroprevalencia de VON encontrada en equinos de acuerdo al sexo en el año 2007.....	48
Fig. 14.- Seroprevalencia de VON encontrada en equinos dependiendo la edad en el año 2007.....	48
Fig. 15.- Especies de mosquitos capturados y porcentajes de captura.....	52
Fig.16 .- Mosquito <i>Cx. quinquefasciatus</i> principal vector de VON en México.....	54
Fig. 17.- Mosquito <i>Cx. erraticus</i> , vector de VON reportado en USA.....	54
Fig.18.- Mosquito <i>Cx. coronator</i> , vector reportado como positivo a VON en USA.....	55
Fig.19.- Fotografía del Gel de Agarosa con 1% de bromuro de etidio en donde se puede observar el resultado de los Pools positivos junto con los controles positivo y negativo.....	56
Fig. 20.- Fotografía del gel de Agarosa con 1% de bromuro de etidio en donde se pueden observar el resultado de los pools negativos al PCR del complejo <i>Cx. pipiens</i>	57

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.- Distribución del serocomplejo de la Encefalitis Japonesa (JE) (Petersen and Roehrig, 2001).....	14
Tabla 2. Infecciones zoonóticas mayores de aves silvestres en Norte América.....	17
Tabla 3. Signos Clínicos en Caballos con encefalitis de VON (Ostlund et al., 2001).....	21
Tabla 4. Total de muestras de suero equinos colectados en el Estado de Nuevo León en el año 2006.....	43
Tabla 5. Total de muestras de suero de equinos colectados en el Estado de Nuevo León, en el año 2007.....	44
Tabla 6.- Frecuencias observadas en equinos de <10 años a > 10 años, con resultados positivos o negativos del virus en el año 2006, en Nuevo León, México.....	49
Tabla 7.- Frecuencias observadas en equinos de <10 años a > 10 años, con resultados positivos o negativos del virus en el año 2007, en Nuevo León, México.....	50
Tabla 8.- Frecuencias observadas en equinos hembras y machos y su relación con o sin infección dada por el virus, en el año 2006, en Nuevo León, México.....	51
Tabla 9.- Frecuencias observadas en equinos hembras y machos y su relación con o sin infección dada por el virus, en el año 2007, en Nuevo León, México.....	51
Tabla 10.- Mosquitos colectados en el ejido Francisco Villa, Pesquería, Nuevo León, México en Septiembre y Octubre de 2007, los datos presentados son No. Mosquitos capturados por especie y los No. pools procesados.....	53

RESUMEN

El Virus del Oeste del Nilo (VON) fue por primera vez detectado en el continente Americano durante una epidemia en aves en la ciudad de New York en septiembre de 1999. Desde entonces los análisis de vigilancia de 2000 a 2002 dice que la infección se ha expandido en Florida, Louisiana, Islas Caimanes y el norte de México. Sin embargo, en el estado de Nuevo León, el último reporte de la enfermedad fue el realizado por Elizondo et al., 2005 y desde ese año no existe reporte alguno sobre la situación actual de la enfermedad; razón por la cual se propuso el desarrollo del presente proyecto para conocer la situación actual de la enfermedad con los siguientes objetivos. 1.- Determinar presencia de anticuerpos contra VON en poblaciones de equinos mediante la prueba serológica de ELISA de bloqueo, 2.- Monitorear la presencia del virus en equinos durante los años 2006 y 2007, 3.- Determinar la presencia del genoma viral de VON en mosquitos mediante la utilización de la prueba molecular RT-PCR, 4.- Identificar las especies de mosquitos vectores de VON en los sitios de reposo de equinos. Se colectó un total de 203 muestras de equinos en 6 localidades del estado de Nuevo León, durante los años 2006 y 2007, 62 muestras pertenecieron al año 2006 y 141 al 2007, de las cuales se encontró un 26% y 48% de seroprevalencia de VON respectivamente. Respecto a los mosquitos, se colectó un total de 7,365 mosquitos en el año 2007, representando 6 géneros y 15 especies los cuales fueron agrupados en 393 pools. Dos pools identificados como *Cx. spp.* resultaron positivos a VON; ambos pools fueron analizados mediante el PCR del complejo *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*) resultando ambos negativos, sin embargo, en la colecta fueron capturados 2 especies más del género *Cx.* (*Cx. erraticus* y *Cx. coronator*) y ambas especies han sido reportadas como positivas a VON en USA, por lo cual se concluye que pueden existir en México, como otras especies que estén jugando un papel importante en la transmisión de la enfermedad. El DNA de ambos pools positivos fueron secuenciados, revelando ser idénticos a las regiones homólogas de aislamientos múltiples tanto de los genotipos NY99 y WN02, debido a lo cual no se pudo identificar el genotipo de VON responsable de estas infecciones.

ABSTRACT

West Nile Virus was first detected in North America during a bird outbreak in the New York City in September of 1999, since then the surveillance analysis from 2000 to 2002 revealed infection have been sprayed to Florida, Louisiana, Caiman Islands and the north of Mexico. However in the state of Nuevo Leon, Mexico, the last report was done by Elizondo et al., 2005 and since that year there is not no one report about the actual situation of the disease, reason why we proposed the present study to know actual situation of the disease with the next objectives. 1.- Determine the presence of WNV in horses through blocking ELISA serologic test, 2.- Identify WNV vector mosquito species in horses resting places, 3.- Surveillance WNV activity in 2006 and 2007, 3.- Determine the presence of WNV viral genome in mosquitoes by means RT-PCR test, 4.- Identify mosquitoes species in horses resting places. We collected a total of 203 horse's serum samples in 6 localities in the state of Nuevo Leon, Mexico during 2006 and 2007, 62 samples were from 2006 and 141 samples were from 2007 which we found a 26% and 48% of seroprevalence respectively. About the mosquitoes, we collected a total of 7,365 mosquitoes in the 2007 year, representing 6 genera and 15 species which were put into 393 pools. Two pools identified as *Cx. spp.* resulted positive to WNV, both of pool were analyzed by means *Cx. pipiens* complex (*Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*) PCR resulting both of them negatives, however in the collect 2 more species of *Cx* genera (*Cx. erraticus* y *Cx. coronator*) were caught and both of the species have been reported like positive to WNV in the USA, because of that we can conclude that could be other species in Mexico who are playing an important role in the disease transmission. DNA of both pools were sequenced revealing be identical to homologous regions from NY99 and WN02 genotypes, reason why we could not identified the WNV genotype responsible of this infections.

1.- INTRODUCCIÓN

En los últimos 25 años aproximadamente, se ha despertado un interés particular en estudiar a los virus emergentes así como las formas en el que el ser humano puede alterar su medio ambiente (Rodas, 2002). Las enfermedades ocasionadas por los virus emergentes son aquellas de aparición reciente, cuya prevalencia es creciente o que tienen el potencial de aumentar su prevalencia (OPS, 2003).

El Virus del Oeste del Nilo (VON) es una enfermedad emergente en las regiones templadas de Europa y, recientemente, en Norteamérica y se ha convertido en una amenaza de salud pública y salud animal. La manifestación más seria de infección por Virus del Nilo Occidental es la encefalitis fatal (inflamación del cerebro) en humanos y caballos, así como la mortalidad entre ciertos pájaros domésticos y salvajes (Secretaría de Salud, 2002; CDC, 2004). La alta viremia en aves y su duración permite la transmisión a mosquitos, y las migraciones que éstas realizan en primavera se han sugerido como las responsables de la introducción en áreas no afectadas (Peña et al., 2005).

El Virus del Oeste del Nilo (VON) fue por primera vez reconocido en el año de 1937 después que fue aislado de la sangre de una paciente febril en el distrito West Nile en Uganda (Komar, 2003). Hasta 1999, la distribución geográfica del virus fue limitada a África, Medio Oriente, Australasia y el Oeste de Centro de Asia con epizootias ocasionales y epidemias en Europa (Murgue et al., 2002; Hall et al., 2002). Pero desde el verano de 1999, la distribución de VON se ha expandido incluyendo los estados contiguos de Estados Unidos de Norte América y 7 provincias Canadienses tanto como México y las islas del Caribe (Estrada Franco et al., 2003; Komar et al., 2003; Blitvich et al., 2003; Dupuis et al., 2003; Quirin et al., 2004). Además de las epidemias en humanos, epizootias en caballos y aves también fueron reportadas en agosto de 1999, en donde de los cuales fueron reportados 25 casos de enfermedad neurológica en caballos en Nueva York (Komar, 2000).

La infección con VON ha sido documentada en una amplia variedad de especies de mosquitos, incluyendo al menos 43 especies en Europa. En el Hemisferio Occidental, a pesar de que se ha documentado que una gran variedad de mosquitos llevan el virus, el género *Culex* parece ser clave y dominante en el mantenimiento de los ciclos locales de *transmisión* a través de infectar a los reservorios (Townsend et al., 2003).

Evidencia serológica de VON ha sido reportada en casi todos los estados Mexicanos (Blitvich et al., 2008; Komar et al., 2006). Sin embargo, la Secretaria de Salud ha reportado solo 7 casos de VON en México. Estos casos ocurrieron en los estados de Chihuahua (n=4), Sonora (n=1) y Nuevo León (n=1) en el año de 2003 y en Sonora (n=1) en 2004.

Muchas especies de mosquitos han sido reportados infectadas con VON en México, incluyendo *Culex nigripalpus* Theobald y *Cx. interrogator* Dyar y Knab en el estado de Chiapas, *Cx. tarsalis* Coquillett en el Estado de Baja California y *Cx. quinquefasciatus* Say en Nuevo León y Tabasco (Elizondo et al., 2005; Hidalgo et al., 2008; Medina et al., 2008; Ulloa et al., 2009). Sin embargo, existe limitado éxito en la obtención de aislamientos de VON de cualquier fuente en México (Blitvich et al., 2004; Estrada et al., 2003; Elizondo et al., 2005; Deardorff et al., 2006). Sin embargo los últimos aislamiento de VON en el norte de México fueron obtenido en los Estados de Sonora y Nuevo León en el año de 2004 (Elizondo et al., 2005).

Debido a los antecedentes anteriores el presente trabajo tiene como objetivo, monitorear la enfermedad en equinos y mosquitos para conocer la situación actual de la enfermedad y sus vectores.

2.- HIPOTESIS

El Estado de Nuevo León se encuentra localizado al noreste de México y es un lugar en donde actividad de Virus del Oeste del Nilo ya ha sido reportada anteriormente; motivo por el cual se encontrarán anticuerpos detectables por medio de la técnica de ELISA de bloqueo en equinos. De igual manera se encontrará positivo el mosquito *Cx. quinquefasciatus* vector principal de la enfermedad y muy probablemente se encontraran otras especies de mosquitos positivas al virus debido a que en la zona de muestreo se encuentran especies que ya han sido reportadas como vectores en otros países.

3.- OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Monitorear y diagnosticar la presencia de VON en equinos y mosquitos en el estado de Nuevo León, México.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar la presencia de anticuerpos de VON en equinos mediante la utilización de la prueba de ELISA de bloqueo, en el estado de Nuevo León, México.

- 2.- Monitorear la presencia del virus en equinos durante los años 2006 y 2007 en el estado de Nuevo León, México.

- 3.- Determinar la presencia del genoma viral de VON en mosquitos mediante la utilización de la prueba molecular RT-PCR, en el estado de Nuevo León, México.

- 4.- Identificar las especies de mosquitos vectores de VON en los sitios de reposo de equinos, en el estado de Nuevo León, México.

4.- ANTECEDENTES

4.1.- AREA DE ESTUDIO

El Estado de Nuevo León se ubica al Noreste de México colindando al Norte con Coahuila de Zaragoza, Estados Unidos de América y Tamaulipas; al Este con Tamaulipas; al Sur con Tamaulipas y San Luis Potosí; al Oeste con San Luis Potosí, Zacatecas y Coahuila de Zaragoza.

La extensión del territorio comprende 64 210 km², representando el 3.3% de la superficie del país y tiene las siguientes coordenadas, al norte 27°49', al sur 23°11' de latitud norte; al este 98°26', al oeste 101°14' de longitud oeste.

El clima es extremoso y las lluvias escasas durante casi todo el año y se puede dividir en tres regiones: una cálida-seca en el norte, una templada en las regiones de la sierra y una semidesértica en el sur. La Sierra Madre Oriental influye de manera importante en la configuración del terreno formando las altiplanicies de Galeana y Doctor Arroyo, las sierras de Iguana, Picachos, Papagayos y Santa Clara y los valles del Pílon, de la Ascensión y de Río Blanco.

En cuanto a su hidrografía el río San Juan abastece a la presa El Cuchillo que provee de agua a Monterrey y a su área metropolitana. También existen las presas de Cerro Prieto, La Boca, Vaquerías, Nogalitos y Agualeguas. La laguna más importante es la laguna de Labradores y la depresión más importante es el Pozo del Gavilán, ambas en el municipio de Galeana. En cuanto flora sobresalen el matorral y los pastizales en las regiones bajas y los pinos y los encinos en la sierras. La fauna de la región está compuesta por osos negros, pumas, jabalíes, zorros, coyotes y venados cola blanca junto con otras especies de menor tamaño (INEGI, 2000).

4.1.1.- MONTERREY Y AREA METROPOLITANA

Esta área se encuentra localizada en un valle, con una altura sobre el nivel del mar de aproximadamente 500 m., y las montañas que la rodean la dotan de una singular belleza. Cuenta con un clima seco estepario con precipitaciones en verano.

La zona metropolitana de Monterrey abarca los siguientes municipios: Apodaca, García, San Pedro Garza García, General Escobedo, Guadalupe, Juárez, Monterrey, San Nicolás de los Garza y Santa Catarina.

4.1.2.- REGIÓN PERIFÉRICA

Esta región forma un anillo que envuelve el área metropolitana. Algunos de sus municipios pertenecen a la Sierra Madre Oriental, mientras que el resto se encuentran distribuidos en la Llanura Costera y en la Mesa del Norte, dándole a la región una gran diversidad climatológica y de paisaje.

Esta región está conformada por los siguientes municipios: Abasolo, Cadereyta de Jiménez, El Carmen, Ciénega de Flores, Doctor González, General Zuazua, Higuera. Marín, Mina, Pesquería, Salinas Victoria, Hidalgo y Santiago.

4.1.3.- REGIÓN NORTE

La mayor parte de esta zona está comprendida por llanuras, encerradas al suroeste por estribaciones de la Sierra Madre Oriental. Su temperatura es cálida y seca la mayor parte del año y la mayoría de los ríos en esta zona son intermitentes, llevando caudal solamente en la época de lluvias.

Los municipios que la comprenden son: Anáhuac, Bustamante, Lampazos de Naranjo, Sabinas Hidalgo, Vallecillo, Villaldama, Agualeguas, Los Aldamas, Cerralvo, China, Doctor Coss, General Bravo, General Treviño, Los Herreras, Melchor Ocampo, Parás, Los Ramones.

4.1.4.- CITRÍCOLA

La región citrícola, se encuentra situada cerca de la Sierra Madre Oriental, es favorecida por un ecosistema con paisajes verdes y floridos, así como un clima semicálido y una precipitación pluvial media anual de aproximadamente 1,000 mm. Gracias a ello prospera el cultivo de cítricos, específicamente la naranja, el limón y la toronja.

Los municipios que comprenden la región citrícola son: Linares, Montemorelos, Allende, Hualahuises, General Terán y Rayones.

4.1.5.- SUR

La región Sur es atractiva por sus densos bosques que tapizan sus montañas. Goza de un clima fresco y agradable que contrasta con el árido y seco de otras regiones del estado.

Esta zona está conformada por los municipios de Aramberri, Doctor Arroyo, Galeana, General Zaragoza, Iturbide, Mier y Noriega.

4.2.- VIRUS DEL NILO (VON) (DESCRIPCIÓN)

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). Al igual que los casos en humanos, las primeras aves documentadas como infectadas por el Virus del Oeste del Nilo en el hemisferio occidental fueron identificadas en agosto del 99 en New York. Como en varios brotes en Europa, el principal vector fue identificado como el mosquito ornitofílico *Cx. pipiens* Linnaeus. Más aún, el brote en humanos ocurrió en siete sitios urbanos cercanos a tierras húmedas donde se concentraban aves migratorias, mosquitos ornitofílicos y humanos (RTV, 2000).

La mayoría de las personas infectadas con el VON 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 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).

El ciclo biológico comparte un huésped no humano, aves principalmente, y un artrópodo (mosquito, garrapata) como vector primario. La mayoría de las veces el ciclo del vector se completa únicamente en las aves y no se detecta hasta que los humanos entran en contacto con el ciclo natural o el virus escapa de este ciclo con un vector secundario o huésped vertebrado debido a algún cambio ecológico afectando entonces principalmente a

caballos o humanos. El virus está presente en las glándulas salivares e infecta las aves durante la alimentación de las hembras de mosquito. Se multiplica entre 1 y 4 días posteriores a la picadura, desarrollándose en las aves inmunidad. El virus persiste en su organismo entre 20 y 200 días. Si hay un número suficiente de mosquitos, éstos mantienen el ciclo extrínseco durante unas 2 semanas aproximadamente y se puede por tanto volver a infectar otro huésped. Humanos, caballos y la mayoría de los otros mamíferos no presentan elevadas viremias de forma habitual, no permitiendo normalmente el mantenimiento del ciclo fuera del que comporta con el ave como huésped. En estos casos el virus sólo se mantiene en sangre unos 3-6 días, hecho que impide que fuera de este periodo el ciclo se pueda mantener gracias a estos huéspedes intermediarios ya que la picadura ocasional de un mosquito no obtendrá sangre infectada.

Aparte de humanos y caballos, el virus ha sido aislado de forma esporádica de otros mamíferos como varias especies de ratones, hámsteres, conejos, camellos, perros o lémures. También se ha encontrado en ranas y caimanes (Aranda, 2003).

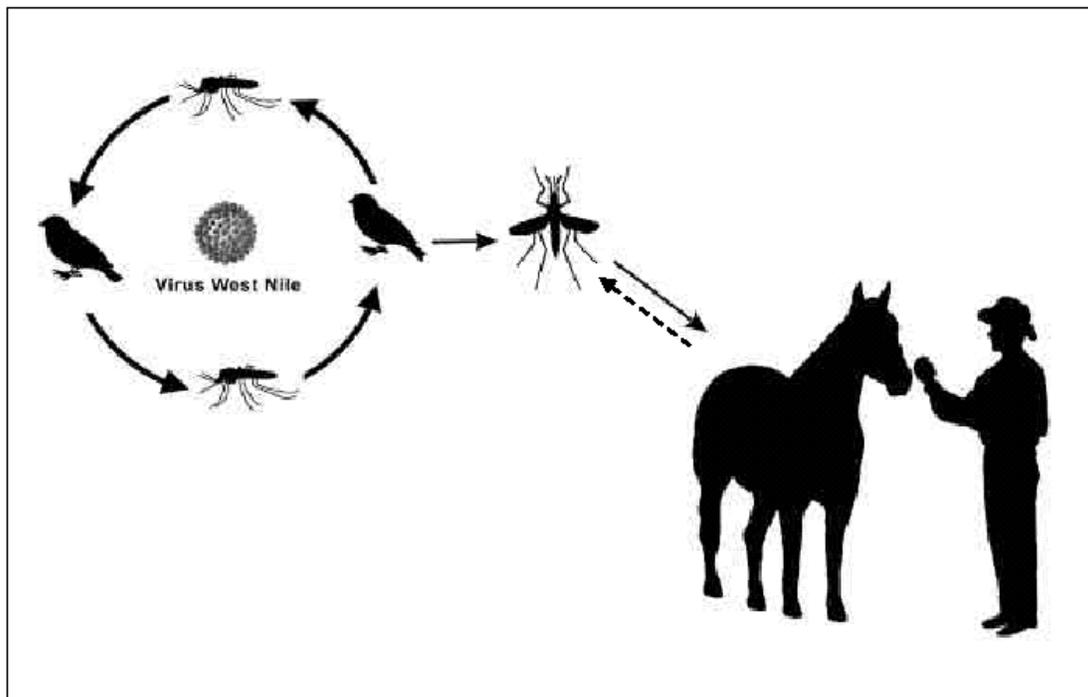


Figura 1. Ciclo del Virus del Oeste del Nilo. Adaptado de Eldridge & Edman

La enfermedad causada en humanos, se caracteriza por ser un proceso febril con período corto de incubación 3-14 días, fiebre moderada (3-5 días) con dolor de cabeza, mialgia, artralgia, linfadenopatía y en menos del 15% meningitis o encefalitis aséptica aguda. El pico de viremia aparece a los 4-8 días post infección. La recuperación es completa y la mayoría de casos letales (del 3 al 15%) han sido descritos en mayores de 50 años. En animales, afecta principalmente a equinos y aves aunque en algunos otros vertebrados se haya podido aislar el virus.

La mayoría de las infecciones humanas de VON 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 (AAM, 2000).

4.3.- DISTRIBUCIÓN DEL VON

El virus del Oeste del Nilo (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 Norte (Egipto, Israel); África Central, Oriental y Sur; Asia (India, Pakistán); Borneo; Europa (Chipre, Francia, Rumania) y, el más recientemente en los E.U.A. Las pruebas para el anticuerpo a VON sugieren que también ha estado presente en Tailandia, las Filipinas, Malasia, Turquía, y Albania (PAHO, 2001).

Los brotes más grandes ocurrieron en Israel de 1950 a 1954 y en 1957; y en África del Sur en 1974. En Israel, en 1957, se observó que los pacientes de mayor edad presentaban como primer síntoma la meningoencefalitis; y esta misma como una complicación en los niños y jóvenes en la India. En 1962, se informó el aislamiento del Virus del Oeste del Nilo de un caballo con encefalitis en Egipto; en el sur de Francia se han presentado brotes en humanos y en caballos de 1962 a 1966, tanto uno como en otros han predominado las meningoencefalitis (Secretaría de Salud, 2002).

La manifestación más grave de la infección es la encefalitis de evolución fatal en el hombre y el caballo, así como la mortandad de ciertas especies de aves salvajes y

domésticas. Otros brotes de encefalitis por VWN han ocurrido en Argelia (1994), Rumania (1996-1997), República Checa (1997), República Democrática del Congo (1998) Rusia (1999) e Israel (2000) (Valles et al., 2000).

4.4.- INTRODUCCIÓN DE VON EN AMERICA

En el continente americano y antes de 1999 no se había detectado la presencia del virus, hasta que en Agosto de ese año se comenzaron a detectar casos en humanos, aves y caballos en EUA, incluyendo algunos casos fatales. Así en 1999 estaba presente en 4 estados con 62 casos en humanos y 7 muertes (Rappole, 2000). En estas se encontraron altos índices de mortalidad en aves, principalmente *Corvus brachyrhynchos* (Eidson et al., 2001). Después se encontró mayor mortalidad en aves silvestres y en cautiverio, las cuales coincidieron con el incremento de casos humanos reportados (CDC, 1999 a, CDC, 1999 b). El principal vector en la epidemia de la ciudad de Nueva York, fue identificado como el mosquito ornitofílico *Cx. pipiens* (Nasci et al., 2001).

En 2000 se había extendido a 13 estados con 21 casos en humanos y 2 muertes. En 2001 se llegó a 27 estados extendiéndose la enfermedad hacia el centro del país, afectando a 66 humanos con 9 casos de muerte. Finalmente, en 2002 prácticamente todos los estados han sido alcanzados (44) y se ha llegado a la sorprendente cifra de 4.156 casos en humanos con 284 muertes (CDC, 2003). Además de los casos humanos, ocurrieron epizootias en aves y caballos, los primeros registros de aves infectadas con el VON en el Hemisferio Occidental ocurrieron en el mes de Agosto del 99 (Steele et al., 2000). Actualmente VON es una enfermedad que reporta anualmente miles de casos en los Estados Unidos de Norte América,

Hasta la fecha se ha detectado también la presencia del virus en otros países del continente americano como Islas Caimán en 2001, Canadá, (2002, 2003), México, (2002, 2003), República Dominicana (2003) y El Salvador (2003) (Pro Med Mail, 2003).

4.5.- EPIDEMIOLOGÍA

La Fiebre del Oeste del Nilo (West Nile Fever) forma parte del conjunto de enfermedades conocidas con el término viriasis transmitidas por artrópodos (arboviriasis). Desde un punto de vista filogenético, todos los arbovirus son virus RNA que se clasifican, según sus características antigénicas en cuatro grandes familias: Togaviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae y Reoviridae. El WNV pertenece a la familia Togaviridae y al género *Flavivirus*, familia flaviviridae (Valles et al., 2000).

Como en la mayoría de arboviriasis, la enfermedad producida por VON es una zoonosis, con un reservorio animal, pájaros en este caso, y cuyo vector es un mosquito. VON se transmite por la picadura de mosquitos de más de cuarenta géneros diferentes, pero con especial predilección por los del género *Culex*. En África el vector más aislado es *Culex univittatus*, en Europa *Culex pipiens* y en Asia *Culex quinquefasciatus*. Se han descrito también como vectores a mosquitos de los géneros *Coquillettidia*, *Culiseta*, *Aedes* y *Anopheles* y en otros artrópodos hematófagos del género *Ornithodoros*, *Rypicephalus* y *Haemophysalis*. La característica común de estas infecciones es que los virus que las producen se multiplican en artrópodos que los inoculan a un huésped vertebrado. Por tanto, las zonas de alta prevalencia o endémicas corresponden a aquellas donde se presentan las condiciones óptimas para la proliferación masiva de los mosquitos vectores. Los hábitos migratorios de muchas de las especies de aves, capaces de albergar la infección por VON, proporcionan al virus la oportunidad de introducirse en aquellas áreas que, albergando poblaciones estables de algún vector potencial, son refugio estacional de las aves portadoras. Pueden transmitirse al hombre y al caballo, donde su impacto a nivel sanitario es mayor, y a otros vertebrados como lémures o roedores, pero, por lo general, esta transmisión se produce de forma indirecta e incidental ya que ni el ser humano ni los équidos forman parte del ciclo natural de estos virus (Valles et al., 2000).

El Virus del Oeste del Nilo (VON) se aisló primeramente en una persona residente en el Distrito Nilo-Occidental de Uganda, aunque tiene una distribución geográfica muy amplia en África, Oriente Medio, Rusia, Sureste Asiático y Australia. De 1937 a 1990, hubo brotes epidémicos, con síndrome febril moderado, en Israel y África, sin embargo, las epidemias de 1996 en Rumania; 1999 en Rusia; 2000 en Israel y 2002 en Estados Unidos de Norteamérica produjeron miles de casos humanos afectados por síndromes neurológicos

diversos probablemente debidos a la aparición de una cepa nueva del VON más virulenta, y potencialmente mortífera. En Canadá, VON fue encontrado en los pájaros de Ontario en el 2001, y al año siguiente, la epizootia abarcó cinco provincias y hubo 400 casos humanos registrados en Ontario y Québec (Carrada, 2004).

En Norte América, los casos humanos de VON fueron detectados por primera vez en la ciudad de Nueva York en Agosto de 1999, y continuaron ocurriendo a niveles bajos en 2000 y 2001 consecuentemente en un área geográfica en crecimiento. En el año 2002, el número de casos se incrementó exponencialmente. (Komar, 2003).

El descubrimiento en el año 2000 de que VON sobrevivió en mosquitos hibernantes del género *Culex* en Nueva York arrojó la esperanza de que el virus no tendría éxito en climas templados y anunció la diseminación de la enfermedad hacia el oeste. De 1999 a 2001 hubieron 149 casos de VON en humanos reportados en los Estados Unidos de Norte América y 18 muertes. En el año de 2002 el número de casos reportados incrementó dramáticamente, con 4156 casos humanos confirmados en laboratorio y 284 muertes. Illinois, Indiana, Ohio, Michigan, Louisiana y Texas reportaron el mayor número de casos. En el año de 2003, el primer caso humano confirmando fue reportado en Carolina del Sur en Julio 7. Para agosto de 2003, el CDC había recibido reportes por un total de 182 casos humanos de VON de 17 estados con 5 muertes reportadas. Al igual que en 2002, 112 casos de 4 estados habían sido reportados. En el 2002, la mayoría de los casos ocurrieron después de la primer semana de Agosto, y se mantuvo el mismo patrón para el 2003 (Sampathkumar, 2003).

En los Estados Unidos de Norte América, cifras anuales de casos de VON durante el período del año 2002 al 2008 alcanzaron de 1356 a 9862 casos (<http://www.cdc.gov/ncidod/dybid/westnile/surv&control.htm>).

4.6.- ESTRUCTURA DE VON

La familia Flaviviridae consiste de 3 géneros: Flavivirus, Pestivirus y Hepacivirus. Los miembros de los 3 diferentes géneros están poco relacionados pero comparten un orden genético similar y conservan características de las proteínas no estructurales. Los más de 70 virus actualmente clasificados en el género Flavivirus están subdivididos en 12 grupos antigénicos (Brinton M., 2002).

Dentro del género Flavivirus VON ha sido serológicamente clasificada dentro del complejo antigénico de la encefalitis japonesa (JE), la cual incluye los virus de JE, Cacipacore, Koutango, Valle de Murray, Encefalitis de San Luis, Usutu y el virus Kunjin (Campbell et al., 2002)

Los flavivirus tienen un centro icosaédrico de 30 a 35 nm de diámetro compuesto de múltiples copias de proteína de cápside de 12-kDa. La cápside encierra una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 12,000 nucleótidos. La cápside está encerrada en una envoltura derivada de una célula huésped que ha sido modificada por la inserción de 2 glicoproteínas integrales de membrana, E (53 kDa) y prM (18-20 kDa). El virión es de 45 a 50 nm en diámetro. Después que el virus madura, la proteína prM es partida a proteína M (8 kDa) por una proteasa celular y la proteína M es incorporada dentro del virión maduro. El genoma entonces codifica 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) que hacen la maquinaria de replicación intracelular del virus. La glicoproteína E, es la proteína estructural más importante inmunológicamente, es la hemaglutinina viral y también media la unión del virus con la célula huésped. Todos los flavivirus están antigénicamente relacionados lo cual explica las reacciones cruzadas serológicas observadas en el diagnóstico de laboratorio. Los miembros del complejo de la Encefalitis Japonesa (JE) están muy cercanamente relacionados por lo que a menudo se necesitan pruebas especializadas (ensayos de neutralización de virus) para diferenciar el flavivirus infectante (Petersen y Roehrig, 2001).

Tabla 1.- Distribución del serocomplejo de la Encefalitis Japonesa (JE) (Petersen and Roehrig, 2001).

Virus	Abreviación por sus siglás en Inglés	Localización Geográfica
Cacipacore	CPC	América del Sur
Koutango	KOU	África
Encefalitis Japonesa	JE	Asia, Oceanía, Australia
Encefalitis del Valle de Murray	MVE	Australia
Alfuy		Australia
Encefalitis de San Luis	SLE	América del Norte América del Sur
Encefalitis del Oeste del Nilo	WNV	África, Asia, Europa, América del Norte
Kunjín	KUN	Australia
Yaounde	YAO	África

4.7.- MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

La serología continua teniendo un papel dominante en el diagnóstico de laboratorio de infecciones virales de VON (y la mayoría de otras infecciones virales) en seres humanos. El desarrollo de anticuerpos neutralizantes virus específicos de VON entre las fases aguda y convalecientes de la enfermedad sigue siendo la evidencia serológica más convincente de infección y es asociada con inmunidad a largo plazo.

Las pruebas serológicas pueden ser desarrolladas en suero o líquido cerebroespinal (CSF). IgM específicas de VON puede ser detectados en suero o CSF por ELISA detectora de IgM en al menos el 90% de pacientes sobre los 8 días de enfermedad. Una vez que los anticuerpos IgM aparecen ellos persisten por más de 6 meses después de la enfermedad en la mayoría de los pacientes y puede persistir por más de 500 días. Por lo tanto contrario a la mayoría de otras infecciones, la presencia de anticuerpos IgM no es indicativo de infección aguda a menos que está sea asociada con enfermedad reciente. Anticuerpos IgM no cruzan

la barrera hematoencefálica por lo que resultados positivos sobre CSF son específicos de infección CNS excepto en los casos de contaminación de CSF con sangre durante la punción lumbar. Los anticuerpos IgG aparecen alrededor del séptimo día de la enfermedad y pueden ser detectados después de 3 semanas de la infección en la mayoría de los pacientes. En infecciones agudas, títulos de IgG pueden incrementar entre los 7 a los 21 días después de la infección. Resultados serológicos falso-positivos pueden ocurrir en pacientes que hayan recibido las vacunas de Fiebre Amarilla o Encefalitis Japonesa (JE) o que hayan sido infectados con estos virus u otros flavivirus como Dengue. Por lo tanto una historia de viaje e inmunización son importantes para interpretar resultados serológicos correctamente. También existe reacción cruzada con Encefalitis de San Luis (SLE), la cual ocurre ampliamente en los Estados Unidos. Resultados positivos de IgG por ELISA pueden ser confirmados con una prueba más específica, prueba de reducción de neutralización de placas (PRNT). El RNA viral puede ser detectado en especímenes clínicos con el uso de PCR. En un estudio de pacientes serológicamente confirmados de enfermedad aguda de VON, la sensibilidad del RT-PCR en CSF y suero fue de 57% y 14% respectivamente. En WNVME fatal, VON puede ser detectado en tejido cerebral por inmunohistoquímica o PCR y técnicas de cultivo (Sampathkumar P., 2003).

El suero IgM puede persistir por períodos largos en algunos sobrevivientes a la encefalitis de VON. La duración de anticuerpos IgM en CSF, o en el suero de pacientes sin meningoencefalitis, es desconocido. En un estudio reciente de pacientes que se recuperaron de meningoencefalitis de VON, el suero IgM fue detectable en el 77% y 60% de estas pruebas aproximadamente 12 y 16 meses después de la aparición, respectivamente. Por lo tanto, en un paciente con meningoencefalitis aguda, IgM VON específico detectado en suero puede ser teóricamente no relacionado a la enfermedad actual. En la mayoría de las áreas de Norte América y Europa, sin embargo, tales ocurrencias son muy raras. Salvo un error de laboratorio, un diagnóstico ambiguo de la infección viral de VON debe hacerse a través de el aislamiento del virus en cultivo de células o ratones recién nacidos, de muestras de CSF, suero o tejidos, seguido por la identificación del virus por medio IFA, usando anticuerpos monoclonales específicos de VON. Sin embargo, aunque la viremia es comúnmente detectable en pacientes febriles de VON, especialmente durante los primeros 4 días de enfermedad, el virus de VON raramente ha sido aislado de suero o CSF de

pacientes con meningoencefalitis. Un número de ensayos de amplificaciones moleculares con incomparable sensibilidad del virus para detección de VON han sido reportados, pero también existe una utilidad limitada en el diagnóstico en el ser humano debido a la baja magnitud y naturaleza pasajera de la viremia. En un estudio de pacientes con meningoencefalitis aguda de VON confirmada, la sensibilidad del RT-PCR para detectar ácido nucleico viral de VON en suero y CSF de pacientes en fase aguda fue de un 57% y 14% respectivamente. En casos fatales de encefalitis de VON, VON puede ser detectado rápidamente en tejido cerebral por inmunohistoquímica o métodos de amplificación molecular y ocasionalmente por cultivo. Raramente, el virus VON ha sido aislado de otros órganos sólidos que tienen alta concentración de células retículo endoteliales (ej. hígado, intestino, pulmón y páncreas) (Campbell et al., 2002).

4.8 MIGRACIÓN DE AVES Y DISPERSION DE VON

Las aves silvestres son importantes en salud pública debido a que ellas pueden ser infectadas por un número de microorganismos patogénicos que son transmisibles a humanos (tabla 1). Además, las aves migrando a través de fronteras nacionales e internacionales pueden llegar a ser grandes vectores para alguna bacteria, virus, parásito o albergar algún organismo resistente a drogas. Esto crea el potencial para el establecimiento de nuevos focos endémicos de enfermedad a través de las rutas de migración. La temporada de migración de las aves silvestres es una de los fenómenos más espectaculares de la naturaleza. Cada otoño un estimado de 5 billones de aves, representando más de 300 especies, migran de Norte América a Centroamérica o Sudamérica; una cantidad similar viaja a través de Europa del Este hacia África (Reed et al., 2003).

Tabla 2. Infecciones zoonóticas mayores de aves silvestres en Norte América

Enfermedad	Microorganismo	Especies de Aves
Encefalitis Viral	Arbovirus (VON, EEE, SLE, WEE)	Numerosas especies (>110), Cuervos, Urracas y raptores son especies centinelas para VON
Enfermedad de Lyme	<i>Borrellia burgdorferi sense stricto</i>	Numerosas especies de pájaros cantores y aves acuáticas
Influenza	Virus de la Influenza A	Aves acuáticas
Enteropatógenos	Salmonella spp.	Numerosas especies de pájaros cantores, gaviotas y aves acuáticas
	<i>Campylobacter jejuni</i>	
Micobacteriosis	Enterococcus glicopéptido-resistentes	Numerosas especies
	<i>Mycobacterium avium</i>	
	<i>Mycobacterium genevense</i>	
Clamidiosis	<i>Chlamydia psittaci</i>	Aves citadinas, pichones, aves de corral

La aves migratorias han sido fuertemente sospechadas como el principal huésped introductorio de VON en las nuevas regiones por las siguientes razones: los brotes del virus en regiones templadas generalmente ocurren durante finales del verano o inicios del otoño, coincidiendo con la llegada de grandes concentraciones de aves migratorias (y mosquitos); estos brotes regularmente ocurren entre humanos viviendo en áreas pantanosas o cerca de estas áreas en donde una alta concentración de aves entran en contacto con un gran número de mosquitos ornitofílicos; anticuerpos contra el virus han sido encontrados en la sangre de muchas especies aves migratorias en Eurasia; VON ha sido aislado de algunas especies de aves activamente migrando, viremia suficientemente larga para infectar mosquitos vectores ha sido documentada en muchas especies de aves y la migración causa estrés fisiológico en aves (el estrés ha sido demostrado que promueve inmunosupresión y aumenta la replicación de VON en roedores) (Rappole et al., 2000).

El brote de VON en 1999 en la ciudad de Nueva York fue inesperado y es un recordatorio que deja en que pensar sobre el impacto que una enfermedad emergente puede tener sobre la salud pública. Nunca antes se vio en el Nuevo Mundo, la epidemia inicial resultara en 62 casos de encefalitis severa en humanos, incluyendo 7 muertes. Además una mortalidad significativa fue notada entre caballos y numerosas especies de aves residentes y exóticas. Aunque la epidemia de 1999 fue fuertemente confinada en el área de la ciudad de Nueva York, los siguientes años trajo una rápida expansión del rango geográfico del virus,

primero a lo largo de la costa este y entonces progresivamente en el interior, alcanzando California en solo 3 años (Reed et al., 2003).

4.8.1 RUTAS MIGRATORIAS

Las aves migratorias de Norteamérica viajan hacia el sur a través de 4 rutas migratorias principales

Ruta del Atlántico: básicamente la siguen las aves que anidan al noreste de Norteamérica y vuelan hacia el sur desde la costa atlántica bien sea despegando de la costa en el norte y cruzando el Atlántico directamente hasta Sudamérica o siguiendo la costa hacia el sur hasta la Florida desde donde cruzan el Mar Caribe, utilizando las Antillas como sitios de parada. Por lo general, los que usan esta ruta llegan a las costas del Noreste de Suramérica, desde el noreste de Colombia hasta las Guyanas.

Rutas Central y del Mississippi: Recoge la mayor parte de las aves del este y centro de Norteamérica que viajan hacia el sur para luego cruzar el Golfo de México y seguir principalmente a lo largo de la costa Caribe centroamericana. Llegan a Sudamérica a través del Darién y el Noroeste colombiano.

Ruta Pacífica: La siguen principalmente aves marinas y costeras (chorlos, correlimos, gaviotas, etc.) y algunas terrestres que en general llegan sólo hasta México y Centroamérica. Básicamente sigue la costa pacífica hasta el sur de Sudamérica en varios casos. Las condiciones ideales para la amplificación y persistencia del virus dependen de tres factores: aves hospederas infectadas, zancudos vectores activos y grandes cantidades de una o más especies de aves hospederas. Esto hace que las especies cuyos miembros forman grandes bandadas durante la migración, dormida o alimentación cerca a humedales, representen el mayor riesgo (Birdnature, 2002).

4.9.- EPIDEMIAS DE VON

Las infecciones por VON han sido reconocidas por muchas décadas. El virus fue aislado por primera vez en la provincia West Nile de Uganda en 1937 de la sangre de una mujer con fiebre y muy pronto llegó a ser reconocido como uno de los flavivirus más

ampliamente dispersos en humanos, aves y mosquitos en África, el medio oriente y el sur de Europa (Zeller 2004).

Las primeras epidemias de encefalitis se reportaron en Israel en los años cincuenta y luego en Francia entre 1962-1963, afectando tanto a humanos como caballos (Berrocal et al., 2006). Durante los años 50's, un estimado de 40% de la población humana en el Nilo en Egipto fue seropositiva para el virus. La gran epidemia en humanos ocurrió en la provincia de Cape, Sudáfrica en 1974, cuando aproximadamente 3,000 casos clínicos del virus fueron documentados (Rappole et al., 2000).

VON también fue implicado como el causante de brotes esporádicos de enfermedad viral leve en África, el Medio Oriente, Asia Occidental y Australia (subtipo virus Kunjin) (Gould et al., 2004); siendo el responsable de grandes epidemias, como las ocurridas en Israel en los años 1950's, Francia (1962), Sudáfrica (1974), Rumania (1996) y Belgrado, Rusia (1999) (Rappole et al., 2000; Lanciotti et al., 1999).

Desde los 90's sin embargo, brotes de VON han ocurrido en Europa y Norte América, y estos brotes recientes han sido asociados con altos rango de encefalitis viral y otros síntomas neurológicos.

Antes no identificado en Norte América, la epidemia de VON fue responsable de 7 decesos humanos tanto como la muerte de cientos de aves y caballos en la ciudad de Nueva York, New Jersey y Connecticut. Aunque el virus se dispersó hacia el oeste durante los próximos 2 años, solamente una actividad moderada de la enfermedad fue vista hasta 2003, cuando el número de casos incrementó drásticamente y para el 2003 la epizootia se había dispersado a todos menos 2 de los 48 estados de EE.UU. El número de casos de VON ha continuado incrementándose ya que para mediados de Febrero de 2004, 9,175 casos humanos y 230 muertes fueron reportados como resultado del brote del año 2003 (Gould et al., 2004). Hoy en día la infección se ha distribuido en todo el territorio de los Estados Unidos (EUA), donde se han notificado más de 16,000 casos en humanos y una cifra considerable en animales domésticos y silvestres (Hidalgo et al., 2008).

El virus VON se ha establecido en Norte América donde ha encontrado vectores competentes, hospederos amplificadores susceptibles y mecanismos eficientes para sobrevivir durante las temporadas frías. Se ha encontrado evidencia de su circulación en el Caribe, Centro América y recientemente en Colombia (Peña et al., 2005).

4.10.- VON EN EQUINOS

La infección de Virus del Oeste del Nilo (VON) en caballos y otros équidos domésticos van desde una enfermedad asintomática a una encefalitis fatal. Una alta proporción de caballos infectados desarrollan encefalitis a diferencia de los humanos. Estudios experimentales sugieren que alrededor de un 10% de caballos infectados desarrollan enfermedad clínica (Bunning et al., 2002). En caballos infectados naturalmente, la infección de VON típicamente causa cambios de actitud (somnia, indiferencia, aprehensión, depresión o hiperexcitabilidad) y signos neurológicos incluyen fasciculaciones musculares y parálisis de los miembros (Komar 2003).

Los caballos son mucho más afectados por VON que cualquier otro animal doméstico; alrededor de un 40% de todos los casos de VON en caballos resulta en muerte, aunque la mayoría de los caballos tienden a recuperarse.

El Virus del Oeste del Nilo (VON), es un flavivirus transmitido por artrópodos que fue históricamente endémico en África, Oeste de Asia y el Medio Oeste. VON fue por primera vez reconocido como causante de enfermedad dentro de los Estados Unidos de Norte América (EE. UU) en caballos, aves y humanos en la ciudad de Nueva York en 1999. (Tanner et al., 2006)

Para el año 2000, VON se había dispersado atravesando Nueva York, en 7 estados del noreste, y aproximadamente 60 caballos fueron reportados a tener encefalitis por VON. A finales de Verano y Otoño de 2001, VON llegó a ser endémico en Florida. Para diciembre de 2001, 738 caballos fueron considerados por el Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal para ser confirmados como casos de encefalitis por VON en 20 estados. De 738, 550 fueron caballos en Florida y sur de Georgia, representando la mayor parte de este brote (Porter et al., 2003).

Tabla 3. Signos Clínicos en Caballos con encefalitis de VON (Ostlund et al., 2001).

Signo	%
Ataxia	85
Debilidad de Miembros	48
Recumbencia	45
Fasciculación Muscular	40
Fiebre	23
Labio paralizado o caído	18
Rechinido de Dientes	7
Ceguera	5

En Long Island, New York, en 1999, 25 caballos presentaron señas clínicas de infección con el virus del Nilo Occidental. Las señas clínicas que se vieron en estos caballos incluyeron letargia, tropiezos y falta de coordinación, debilidad en las extremidades, ataxia, parálisis parcial, y muerte. Por lo general no se observó fiebre. Otras señas que pueden indicar infección con el virus del Nilo Occidental en los caballos incluyen deterioro de visión, inclino de la cabeza, convulsiones, no poder tragar, movimientos en círculos, sobre-excitabilidad, o coma (Rey, 2001) La enfermedad en caballos llamada Lourdige en francés, causa parálisis de las patas y debilidad en su forma encefalomiélica (Aranda, 2003).

Los signos clínicos difieren entre brotes. Durante el brote en Italia y Francia la ataxia y recumbencia fueron los principales signos (Cantile et al., 2000, Murgue et al., 2002), en Israel y Estados Unidos los signos clínicos fueron indicativos de daño cerebral (Snook et al., 2001, Steinman et al., 2002).

Fig. 2 Signología de VON en equinos (Patas cruzadas) (Foto: Juan Lubroth, USDA).

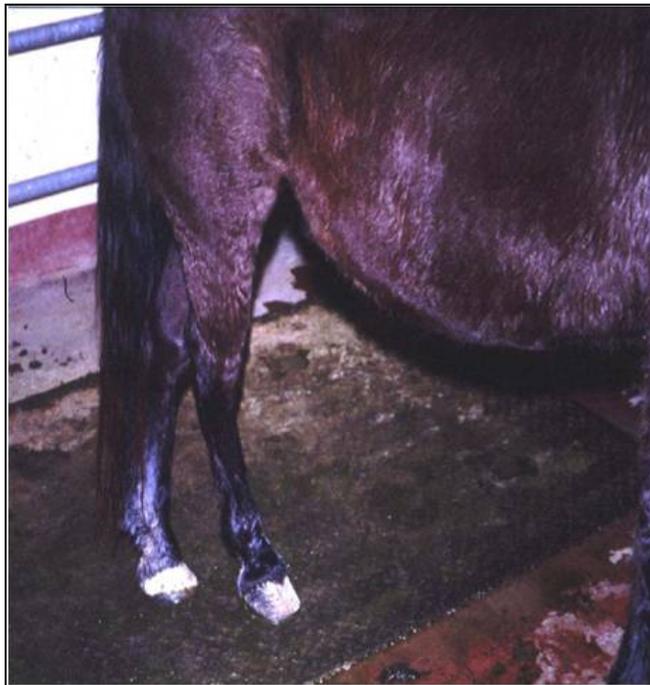


Fig. 3 Signología de VON en equinos (Patas abiertas) (Foto: Juan Lubroth, USDA).



4.10.1 EPIZOOTIAS EN EQUINOS

Se ha encontrado evidencia serológica de infecciones por VON en equinos en Egipto 1956 (Taylor et al., 1956) e Israel 1960. Tres años más tarde se aisló el virus de una yegua con desordenes del sistema nervioso (Murgue et al., 2002). Desde entonces el VON ha sido reportado en Francia (Murgue et al., 2001), Portugal (Murgue et al., 2001), Marruecos, Italia (Cantile et al., 2000), e Israel (Steinman et al., 2002).

En Octubre de 1999 , se confirmó el primer caballo infectado con Virus del Oeste del Nilo en Nueva York, solo fue el primero de 25 más reportados infectados y de ellos 36% murieron (Ostlund et al., 2001).

Desde su introducción a Norte América en 1999, el VON ha causado más de 15000 casos de enfermedad neurológica en caballos, y llegó a ser oficialmente endémico en 2003. Vigilancia serológicas demostraron su presencia en caballos en México (Blitvich et al., 2003).

4.11.- VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE VON EN EQUINOS

El control y la prevención del WNV están dirigidos principalmente hacia sus vectores y huéspedes. Esto significa una vigilancia activa de las aves para detectar posibles mortandades entre las poblaciones salvajes que servirían como centinelas de la eventual presencia del WNV, así como la vigilancia activa del mosquito vector y la identificación de otros potenciales vectores en una zona concreta. Finalmente, es importante potenciar la vigilancia epidemiológica pasiva tanto en animales de granja (veterinaria) como en seres humanos. En el ámbito veterinario debe potenciarse la declaración de enfermedades neurológicas en animales, especialmente aves y caballos, estos últimos por ser los únicos mamíferos que, en su relación con el hombre, pueden infectarlo con el WNV. En humanos debería implementarse la declaración obligatoria de los casos de encefalitis y meningitis asépticas sin diagnóstico etiológico (Valles et al., 2000).

En el 2002, más de 15,000 caballos en 40 estados fueron diagnosticados con causa de enfermedad asociada con VON y aproximadamente una tercio de estos caballos murió o fue eutanizado (Campbell et al., 2002).

La SAGARPA recibió reportes de caballos con síntomas de encefalitis de varios Estados de México en el 2002; se tomaron muestras de suero de equinos de 14 estados, los cuales fueron probados por ELISA. De 441 muestras 97 (22%) tuvieron anticuerpos específicos para WNV, encontrando este virus en seis estados de México: Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, y Yucatán (Estrada-Franco, *et al.* 2003).

Del 2001 al 2003 en El Salvador, 18 (25%) de 73 muestras de suero de equinos estables o muertos tuvieron anticuerpos neutralizantes para WNV, lo que sugiere que esta encefalitis ha extendido su rango y se está dispersando en Centro América (Cruz, *et al.* 2005).

En el Estado de Nuevo León México en el 2003 se tomo tejido cerebral de un caballo adulto (12 años) muerto, el cual antes de morir presentó síntomas neurológicos, mostrando una alta relación filogenética con la cadena de WNV circundante en el área de Texas (Blitvich, *et al.* 2004)

Del 2003 al 2004 en Guadalupe, una isla perteneciente al mar Caribe, 487 muestras de equinos (437 caballos, 34 burros, 16 ponis) de los cuales 94 (19.3%) fueron seropositivas para WNV (Lefrançois. *et al.*, 2005).

En 2004, California se convirtió en el epicentro de la enfermedad, con 540 casos clínicos confirmados del WNV. Todos los casos confirmados dieron resultados positivos en laboratorios y tuvieron signos compatibles. Los casos afectaron 32 de los 58 condados de California. Un alto porcentaje de esos caballos murieron o hubo que sacrificarlos. Sólo 22 de los 540 casos habían sido completamente vacunados. En Agosto del 2004 de 431 equinos (386 caballos, 27 burros, 18 ponis), de los cuales 70 (16.2%) presentaron anticuerpos para WNV (Lefrançois. *et al.*, 2005).

Sueros de caballos provenientes de la Habana fueron probados para anticuerpos en contra de WNV mediante ELISA, probaron 210 sueros, de los cuales 19 resultaron positivos para flavivirus (9%) de los cuales cuatro fueron positivos para VON, dos provenientes de la Habana y otros de otras provincias (Pupo, *et al* 2006).

En 19 estados de Guatemala, se colectaron 352 muestras de suero de caballo de septiembre del 2003 a Marzo del 2004 para estimar la dispersión y el riesgo potencial para la salud del WNV; las muestras fueron probadas por ELISA de Bloqueo; obteniendo 149 positivas (42.3%) (Morales-Betoulle, 2006)

4.12.- EQUINOS COMO HUESPEDES TERMINALES

Antes de 1999, VON había sido reportado como causante de encefalomiелitis en Egipto, Francia, Marruecos, Israel e Italia. El ciclo biológico de VON en la naturaleza se mantiene entre mosquitos infectados y aves susceptibles; sin embargo, puede transmitirse a una diversidad de especies, sobre todo mamíferos, reptiles y seres humanos (Hidalgo et al., 2008).

Mientras que el virus puede infectar humanos y caballos, no hay registros de que los caballos infectados pueden transmitir el virus a caballos no infectados u otros animales. Las aves migratorias parecen jugar un rol mayor en la dispersión de la infección de VON y está llegando a ser una de las amenazas de salud de rápido crecimiento a caballos y equinos de toda la nación (Galván et al., 2005).

Estudios previos no resolvieron la pregunta de si equinos infectados con VON producen niveles de viremia de suficiente magnitud y duración para infectar mosquitos vectores; sin embargo, Schmidt y Mansoury (1963) reportaron que niveles detectables de viremia no se desarrollaron en caballos inoculados.

En un estudio realizado por Buning et al. 2002, en donde un total de 12 caballos de diferentes razas y edades fueron infectados con VON mediante picaduras de mosquitos del género *Aedes albopictus* previamente infectados con el virus, cuando las viremias en caballos estuvieron en su nivel más alto, los caballos se expusieron a mosquitos para que estos se alimentaran. Todos los mosquitos que se alimentaron de los caballos fueron negativos. Los caballos infectados con la cepa NY99 desarrollaron niveles de viremia bajos de corta duración, por lo tanto, caballos infectados son poco probables que sirvan como huéspedes amplificadores importantes para VON en la naturaleza.

4.13.- IMPACTO ECONÓMICO DE VON EN EQUINOS.

El impacto económico de VON en la industria de los equinos es un área que no recibe mucha atención, sin embargo, en los círculos académico y de salud pública, el tema ha sido preocupante desde la aparente rápida distribución de la enfermedad. Observando específicamente a la industria equina, pocos estudios han sido publicados planteando el

efecto económico que VON ha tenido en esta industria. Conociendo el incremento en la diseminación de la enfermedad y los resultados potenciales de salud en humanos y equinos, el impacto económico parece ser un área importante para discutir. El estudio más extensivo fue realizado en Colorado y Nebraska en el año 2002. Este fue un estudio crítico en el que fue la primera vez que los investigadores han puesto un número cuantitativo sobre el costo de VON en equinos. Para el período de estudio de 2002, Nebraska tuvo 1100 y Colorado tuvo 378 casos de equinos reportados y confirmados, para un total de 1478 casos. Estos números pueden ser bajos debido a la baja prevalencia de la confirmación de laboratorio en esta población. El costo estimado de pérdida de ingresos debido a los caballos que no estuvieron disponibles durante el período de tratamiento y recuperación es aproximadamente 163,000 dólares. El costo atribuido a muerte o eutanasia de 432 equinos en Colorado y Nebraska fue estimado en 600,600 dólares. Los veterinarios encuestados se les pidió estimaran el costo por tratamiento en casos medios, moderados y severos. Sus estimados fueron de 200, 400 y 250 dólares respectivamente. Considerando el número de casos para Colorado y Nebraska, el costo total para todos los tratamientos fue de 490,844 dólares.

El tratamiento y prevención en poblaciones humanas y equinas has sido frecuentemente debatidas en años recientes. El costo de análisis sobre la efectividad de la vacuna contra los costos es un tema que todos los estados afectados por VON se han preguntado. Con respecto a los costos, un promedio de tratamiento de la vacuna de 2 dosis fue de 50 dólares. Para los propietarios de los caballos afectados en Colorado y Nebraska, los estimados de lo que gastaron combinados resultó en 2.75 millones de dólares en 2002 en prevención. Este número asume que un mero 25% de la población de equinos fue vacunado.

En Texas, hay más de un millón de caballos contabilizados por un valor de 4.2 billones de dólares. El impacto de la industria equina sobre la economía de Texas está sobre 11 billones de dólares por año. Estos son aspectos importantes que se deben de tomar en cuenta cuando se está tratando con una enfermedad como VON (Galván et al., 2005).

4.14- PRUEBA DE ELISA

La técnica se basa en dos ideas: 1. – Uno de los reactivos, antígeno o anticuerpo, es inmovilizado por absorción en una matriz sólida, y el reactivo absorbido es usado para capturar anticuerpos o antígenos homólogos de la muestra probada. Una enzima se encuentra unida covalentemente a una globulina de una molécula de inmunoglobulina, produciendo un conjunto que retiene la actividad bioquímica e inmunológica; la exposición de este complejo para un adecuado rendimiento de la reacción, y la velocidad de la reacción o la absorbancia final es medida por un espectrofotómetro. La técnica ELISA permite la detección de diminutas trazas de antígeno, esto se lleva a cabo en los hoyos de una microplaca de poliestireno. Las enzimas que son más frecuentemente conjugadas para la molécula de inmunoglobulinas son fosfatasa alcalina y peroxidasa. El análisis de ELISA es llevado a cabo por una de tres diferentes maneras, el directo, el indirecto y el método sándwich. (Clements, 1999).

4.15.- AISLAMIENTO Y MONITOREO DE WNV EN MOSQUITOS

En el 2000 se implemento un programa de vigilancia para monitorear brotes de WNV sobre los mosquitos, en 1999; esto se debió a los primeros brotes del WNV 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 25 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 (Nasci, *et al.*, 2001).

En Connecticut, en el periodo de Junio a Octubre del 2000 se obtuvieron 14 aislamientos de WNV de 4 especies de mosquitos (*Cx. pipiens* (5), *Cx. salinarius*, *Cx. restuans* (4), y *Cs. melanura* (3). 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 WNV 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 WNV a nivel de aves silvestres, y *Cx. salinarius* pudo haber sido el puente entre humanos y caballos (Andreadis, *et al.*, 2001).

Se monitoreo la prevalencia del WNV 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 WNV, esto, entre mediados de Julio a finales de Septiembre, 18 fueron de hembras y 1 de machos de *Culex* sp, y 1 de *An. punctipennis* (Say). 14 de los grupos los capturaron trampas de gravidez y el resto en trampa de luz con CO₂ (Yaremych, *et al.*, 2004).

En California se aisló el WNV de mosquitos *Cx. tarsalis* y *Cx. quinquefasciatus*, en el condado Imperial (16 grupos positivos), en Los Ángeles, 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 (Reisen, *et al.*, 2004).

De Enero del 2003 a Marzo del 2004, en el condado Harris, en Texas se detecto WNV en 400 pools de mosquitos (28 mosquitos/pool), los cuales 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 WNV 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 (Tesh, *et al.*, 2004).

De Junio a Septiembre de 2003 mosquitos fueron colectados en el Ejido Francisco Villa del Municipio de Pesquería, Nuevo León, México por medio de trampas de luz CDC cebadas con hielo seco y aspiración mecánica en sitios de reposo en vegetación y casas. Se colectó un total de 2,297 mosquitos representando 4 géneros y 11 especies los cuáles fueron procesados en 238 pools. Como resultado un pool resultó positivo siendo el primer aislamiento que se reporta en México en un pool de *Cx. quinquefasciatus*. (Elizondo et al., 2005).

Otro estudio realizado en Mexicali, Baja California México; en donde se muestrearon con trampas de CO₂ y tubos de aspiración 2,333 mosquitos distribuidos en 92 grupos desde septiembre de 2005 a agosto de 2006. Las muestras de mosquitos se identificaron y se probaron por transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RTPCR) agrupados por especie y por mes de colecta, con lo cual se estimó la abundancia relativa de cada especie de mosquito por mes y la tasa de infección por VON. Se identificaron 7 especies de mosquitos, tres de las cuales fueron positivas a VON: *Aedes vexans* en el mes de octubre de 2005, *Culex tarsalis* en mayo de 2006 y *C. pipiens/quinquefasciatus* en noviembre de 2005 y abril de 2006 respectivamente. La abundancia relativa de las especies encontradas positivas fue mayor durante los meses de primavera y otoño (Medina et al., 2008).

En el año de 2005 fue realizado un estudio en dos zoológicos del estado de Tabasco, México; en donde se capturaron 1202 mosquitos que se clasificaron taxonómicamente y se agruparon en 35 mosquitos (cuadro IV). En un grupo de mosquitos *Culex quinquefasciatus* capturados en el zoológico Yum-Ká se detectó un fragmento de 408 pb del genoma de VON (Hidalgo et al., 2008).

El estudio más reciente realizado en México fue en el estado de Chiapas en el año 2006, en donde fueron colectados más de 32,000 mosquitos representando 13 especies y 7 géneros. Las 7 especies más abundantes fueron seleccionadas para las pruebas de detección del virus: *Anopheles albimanus*, *An. crucians*, *Ochlerotatus taeniorhynchus*, *Cx. interrogator*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. coronator*, and *Mansonia titillans*. VON fue detectado en 2 pools, 1 de *Cx. interrogator* y otro de *Cx. nigripalpus* (Ulloa et al., 2009).

4.16.- TRANSMISIÓN VERTICAL DE VON Y OTROS ARBOVIRUS

En otro estudio se colocaron 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 (Shroyer, 1990).

A pesar que se ha detectado el WNV 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 investigo si existe una transmisión vertical, como medio de sobrevivencia viral, por lo que en un estudio se inocularon intratoraxicamente a *Cx. pipiens* y *Ae. albopictus* con WNV, 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 (Dohm, *et al.*, 2002b).

4.17.- COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN Y TRANSMISIÓN EXPERIMENTAL DE VON.

Se evaluó el potencial de los mosquitos de New York para transmitir el WNV, los mosquitos que se colectaron por trampa de luz con CO₂, los inocularon oralmente, dejando que se alimentaran de pollos infectados con WNV, 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 (Turell, *et al.*, 2000).

En experimentos de las tasa de infección, diseminación y transmisión para mosquitos expuestos oralmente al WNV, 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 oscilo 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 intratóraxica encontraron un 94% de transmisión (Sardelis, *et al.*,2001).

En California se estudio la competencia vectorial de varios mosquitos para el WNV , los cuales fueron infectados oralmente por alimentación con gotas de sangre de conejo, con WNV 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 Cache 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 Cache Valley, se encontró con transmisión de <6%, por lo que se consideró un vector pobre para WNV (Goddard, *et al.*, 2002).

Un total de 17,220 mosquitos pertenecientes al genero *Culex* fueron colectados en tres sitios diferentes cercanos a el área metropolitana de Nueva York, en donde evidencia de WNV fue encontrada en pools de las tres localidades; pero el numero de pools positivos vario dependiendo el sistema de detección usado; al comparar el RT-PCR con cultivos celulares encontraron que el primero de estos era mas efectivo con 36 pools positivos a comparación de los cultivos celulares en los cuales solo encontraron 8 positivos (Nasci, *et al.*, 2002).

Se comparo la trascripción inversa de la reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR) Taq Man[®], con el ensayo en placas de células Vero y el ensayo antigénico Vec Test[™] para la detección del RNA viral del WNV en mosquitos colectados en campo, procedentes de Staten Island, durante la epidemia de WNV en el 2000; estos mosquitos fueron identificados a especies y los agruparon en pools de 50 individuos, en total probaron 10,866 especimenes, agrupados en 801 pools, y concluyeron que el ensayo de placa detectó

el 74% de los pools positivos por 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 por el ensayo en placa de células vero (Nasci, *et al.*, 2002)

4.18.- CAMBIO CLIMÁTICO Y LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR.

Uno de los factores en los cuáles debe de prestarse atención en cuanto al tema de enfermedades emergentes y reemergentes, es el cambio climático ya que este ocurre en ciclos continuos (Loehle C., 2004). El cambio climático puede atribuirse tanto a causas naturales y antropogénicas. Modelos han indicado que el cambio climático es el resultado de tanto de variabilidad climática natural como fuerzas antropogénicas. Estos modelos indican que durante la primera mitad del siglo 20 fue debido a la variabilidad natural del clima mientras que la segunda mitad del siglo 20 fue debido a la influencia humana. Fuerzas antropogénicas en la segunda mitad del siglo 20 condujeron a cambios en la temperatura, incluyendo cambios totales en la temperatura media tanto como cambios en el gradiente de temperatura entre las regiones del norte y del sur, contrastes de temperatura entre tierra y océano y redujo de temperatura diaria (Karoly D. et al., 2003). Sin embargo, otros estudios indican que aún no es posible distinguir entre causas naturales y antropogénicas y ambos contribuyen al cambio climático (Tett SFB. et al., 2002).

Los procesos ecológicos son influenciados por el clima, la variación en el clima tiene tanto influencias directas como indirectas sobre los procesos ecológicos. Las influencias directas envuelven cambios en la fisiología del organismo incluyendo procesos reproductivos y metabólicos mientras que la influencia indirecta envuelve cambios en el ecosistema y la relación entre presa, predadores y participantes (Stenseth NC. et al., 2002).

El clima afecta la distribución de las enfermedades transmitidas por vector mientras que el tiempo afecta la coordinación e intensidad de los brotes de estas enfermedades. El clima afecta la distribución de los vectores, tales como mosquitos a áreas mientras donde las temperaturas permanecen en cierto rango, estos climas limitan el rango de las enfermedades transmitidas por estos vectores. El tiempo tal como la temperatura y

precipitación, afecta la biología de los vectores. Eventos extremos en el tiempo como huracanes, no solo infligen daños y muerte sobre el área sino también contribuyen a los brotes de muchas enfermedades, especialmente enfermedades transmitidas por mosquitos (Gubler et al., 2001).

El clima, ecología del vector y la economía social económica varían mundialmente y por lo tanto las enfermedades transmitidas por vector exponen variaciones regionales. En los trópicos y subtropicos, malaria y dengue son algunas pocas de las enfermedades transmitidas por vectores más comunes. En Europa y los Estados Unidos, enfermedad de Lyme tanto como varias encefalitis virales son las más importantes. De hecho, en algunas áreas, la transmisión de las enfermedades transmitidas por vector puede actualmente ser reducidas cuando las temperaturas exceden el máximo rango para los vectores. Esto se ha visto en Senegal, donde la prevalencia de malaria ha caído más del 60% y el vector predominante ha desaparecido virtualmente de las áreas en los últimos 30 años.

Las enfermedades transmitidas por vectores están dentro de las enfermedades en las cuales hay más preocupación debido a que los mosquitos son extremadamente sensibles a las condiciones climáticas. Condiciones de frío limitan el rango de los mosquitos y la transmisión de las enfermedades. Alternativamente condiciones cálidas, tales las que pueden ser producidas por el calentamiento global, causan que el ciclo de transmisión de la enfermedad ocurre más rápidamente debido al incremento tanto del rango del desarrollo larval y el período extrínseco de incubación de la enfermedad. Esto en su momento podrían incrementar la velocidad de la distribución epidémica de la enfermedad (asumiendo que existe el agua adecuada para criaderos de mosquitos continuos) (Shope et al., 1991). Además al incrementar la temperatura, el calentamiento global podría conducir a intensificar las inundaciones a través de las cuales crearan sitios de criaderos para mosquitos.

Aunque el calentamiento global por si mismo indudablemente tiene efectos significantes sobre las enfermedades transmitidas por vector, la mayor transmisión de estas enfermedades pueden ser influenciadas más por el variabilidad climática incrementada asociada con el calentamiento. Los vectores de enfermedades, especialmente mosquitos vectores, son muy diversos en su biología, con algunas especies prefiriendo climas extremadamente húmedos y otras prefiriendo climas extremadamente secos. La variabilidad

climática incrementada podría potencialmente conducir a incrementar la variabilidad en las comunidades de mosquitos y de este modo en las enfermedades transmitidas por estas diferentes especies.

Las enfermedades transmitidas por vectores han sido demostradas a ser afectadas por condiciones climáticas atípicas. Enfermedades transmitidas por mosquitos tales como encefalitis de San Luis (SLE) crecen en condiciones cálidas de invierno seguidas por veranos calientes y húmedos. Estas condiciones han sido demostradas que facilitan la emergencia de nuevas enfermedades en los Estados Unidos cuando VON apareció por primera vez en la ciudad de Nueva York en 1999. Similarmente, hantavirus comenzó a aparecer en humanos a inicios de 1990 debido a largos períodos de sequía interrumpidos por lluvias intensas (Epstein PR., 2000).

Una enfermedad transmitida por vectores de particular preocupación es la malaria; el rango geográfico de malaria es pequeño que su rango potencial se basa en la distribución de las poblaciones del vector, un fenómeno referido como “Anofelismo sin malaria”. Modelos de riesgo de malaria indican que estas áreas, en las cuales vector existe pero la transmisión de malaria es limitada por la temperatura, son áreas en las cuales el incremento en la transmisión de malaria puede ocurrir en el futuro con el incremento en la temperatura debido al cambio climático.

El rango de la fiebre de dengue también se está expandiendo. Previamente limitada en este rango por los 10 °C de invierno y una elevación de 1000 m, la enfermedad ahora ha sido detectada a los 1700 m en México y el vector de la enfermedad ha sido encontrado a los 2200 m en Columbia. Modelos climáticos con dengue han demostrado que el potencial epidémico se incrementa con un pequeño incremento en la temperatura, indicando que dengue podría extenderse y mantenerse en poblaciones vulnerables con pocos mosquitos. Además zonas marginales (regiones no endémicas limitando con áreas endémicas) que constan tanto de poblaciones humanas susceptibles y el vector, pero la transmisión es limitada por la temperatura. Brotes de dengue en estas áreas pueden ser más severos debido a que las poblaciones carecen de inmunidad antes de la exposición (Patz et al., 1998).

En un estudio realizado en San Antonio, Texas, se encontró que el tiempo de incubación del virus de la Encefalitis San Luis en *Cx. quinquefasciatus*, 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% (Hurlbut, 1973).

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 WNV que obtuvieron de cuervos muertos durante los brotes, los mosquitos se alimentaron de pollos virémicos, 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 WNV en la naturaleza (Dohm, *et al.*, 2001, Dohm, *et al.*, 2002a).

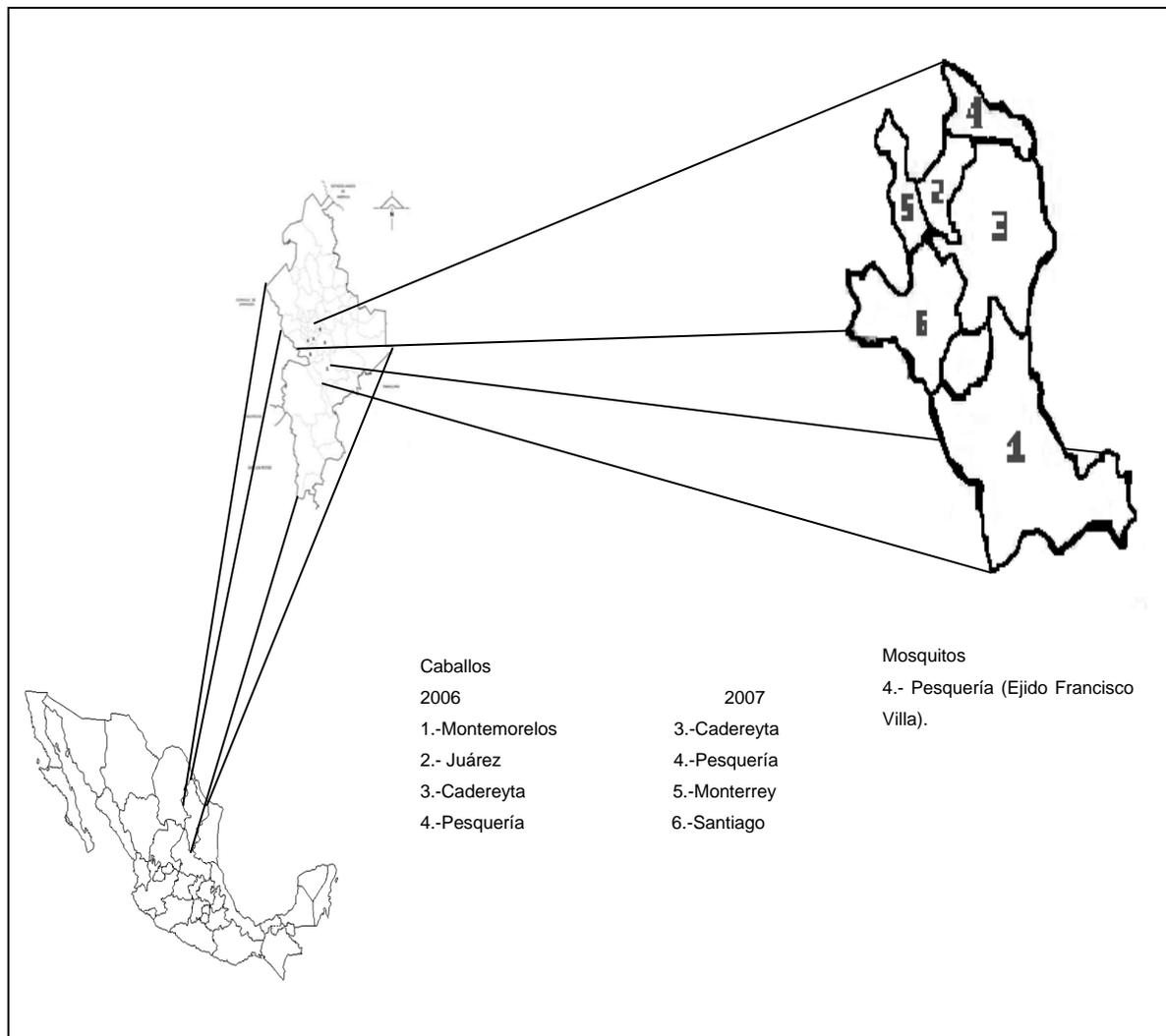
Sin embargo, los principales factores en la erradicación de malaria, dengue y otras enfermedades transmitidas por mosquitos son cambios humanos en el estilo y condiciones de vida.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- AREA DE ESTUDIO

Los equinos fueron muestreados en 6 municipios del Estado de Nuevo León, México. Los municipios de Cadereyta, Montemorelos, Pesquería y Juárez fueron muestreados en el año 2006 y los municipios de Cadereyta, Pesquería, Monterrey y Santiago en el año de 2007. Los mosquitos fueron colectados en el ejido Francisco Villa, municipio de Pesquería, que se encuentra localizado a 30 kilómetros al noreste de la ciudad de Monterrey, en el estado de Nuevo León, México ($25^{\circ} 42' 11.9''$ N y $100^{\circ} 00' 14.0''$ W).

Fig. 4.- Localización del área de muestreo



5.2.- MUESTREOS EN CABALLOS

Se realizaron muestres en los meses de Abril, Junio y Agosto en el año 2006 y en los meses de Septiembre y Octubre en el año 2007. Los muestreos consistieron en recorrer todo el municipio buscando caballos los cuáles fueron sangrados. Todos los caballos muestreados fueron no vacunados, asintomáticos y no tenían antecedentes de enfermedad.

5.2.1.- TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras en equinos se realizó mediante punción de la vena yugular utilizando agujas hipodérmicas número 20GX1.5” con jeringas de 5 ml, una vez obtenida la muestra se depositaron en tubos vacutainer de 5ml con heparina, posteriormente se depositaron en hielo para su transportación al laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

5.3.- MANEJO DE MUESTRAS

Una vez que las muestras fueron transportadas al laboratorio fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 10 minutos para obtener solo el suero (sobrenadante), el cuál fue colocado en tubos eppendorf y se descartó el paquete celular, una vez terminado este paso fueron congelados para la posterior realización de la prueba de ELISA de bloqueo.

5.4.- TÉCNICA DE ELISA DE BLOQUEO

Para el procesamiento de las muestras se utilizó la prueba de ELISA de bloqueo descrita por Hall y modificada por Blitvich (Blitvich et al., 2003).

El primer paso de la prueba es la Sensibilización de la placa, que consiste en cubrir los 60 pozos internos de una placa de ELISA (placa de 96 pozos no tratada con cultivo de tejido, fondo plano) con 100 µl de antígeno diluido en una solución de carbonato-bicarbonato a una dilución 1:200; una vez cubierta la placa se deja incubar toda la noche dentro del refrigerador a 4 °C.

El antígeno es preparado de células de mosquitos infectadas con VON (células C6/36 o ATC-15).

La solución carbonato-bicarbonato consiste en 50mM de Carbonato de Sodio (5.3 gr), 50mM de Bicarbonato de Sodio (4.2 gr), se ajusta el pH a 9.6 con ácido clorhídrico y se almacena a 4 °C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación las placas fueron lavadas 4 veces con solución PBS (phosphate buffered saline pH 7.5) +0.1% de Tween 20 agregando 200 µl por cada pozo. Después de lavar las placas se agregó el buffer de bloqueo que consiste en PBS + Tween 20 + 5% de leche en polvo sin grasa (este buffer también se almacena a 4 °C) y se incubó a 37 °C durante 1 hora; posteriormente de la misma manera que en el paso anterior se procedió a lavar la placa 4 veces con solución PBS.

Después de lavar las placas se diluyeron las muestras de suero 1/10 obteniendo un volumen final de 60 µl de los cuáles se agregó 50 µl en cada pozo. Todas las diluciones de los sueros se prepararon en otra placa de 96 pozos durante el paso de 1 hora de bloqueo de esta manera la transferencia a la otra placa fue más fácil utilizando una pipeta multicanal.

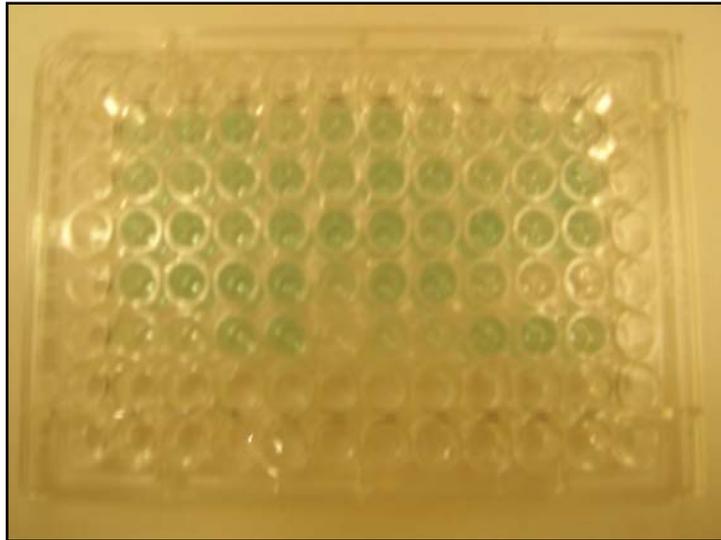
En cada placa se incluyó un grupo de controles positivos (suero infectado con VON) y un grupo de controles negativos (sueros no infectados) de los cuáles se agregaron 50 µl en cada pozo.

Una vez que se agregaron los sueros se incubó durante 2 horas a 37 °C; transcurrido el tiempo se lavó la placa 4 veces.

Después de lavar las placas se diluyó el anticuerpo monoclonal (MAb 3.1112G, Chemicon Internacional MAB8152) en buffer de bloqueo; la dilución óptima fue de 1/200. De la solución de MAb preparada se agregó 50 µl en cada pozo y se incubó a 37 °C por un período de 1 hora; transcurrido el tiempo se lavó la placa 4 veces.

Lavada las placas se procedió a diluir el conjugado (Horse Radish Peroxidasa-labeled rabbit anti-mouse IgG, Zymed laboratorios, Cat. Num. 61-6520) a una dilución 1/2000 en buffer de bloqueo; se agregó 50 µl del conjugado en cada pozo y se dejó incubar durante 1 hora a 37 °C, transcurrido el tiempo se lavó la placa 4 veces con solución PBS+Tween 20 y se agregó 75 µl de la solución reveladora (KPL laboratorios, Cat. Num. 50-62-00) que consiste en ABTS solución A y solución B a una proporción 1:1. En donde a diferencia de la ELISA convencional las muestras positivas no presentaron color.

Fig. 5. Placa de la prueba de ELISA, el color verde es negativo.



Se midió la densidad óptica (OD) a 415 nm; la densidad óptica se midió a intervalos regulares hasta que el promedio de OD para el suero control exceda 0.3 (esto usualmente toma 10 a 20 minutos). Se excluyeron los sueros control que dieron el valor más alto y más bajo y se usó el promedio de los 4 restantes.

5.4.1.- ANÁLISIS DE OD

Se calculó el % de valor de inhibición del suero que se está probando usando la fórmula descrita en el JCM Blitvich et al, 2003.

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{100 - (TS - B)}{CS - B} \times 100$$

TS= OD del suero que se está probando

CS= OD del suero control (de animales no infectados)

B= Background OD

5.5.- COLECTA DE MOSQUITOS

Los mosquitos fueron colectados durante los meses de Septiembre y Octubre del año 2007 en el ejido Francisco Villa, del municipio de Pesquería, Nuevo León, con trampas de luz CDC con CO² (Fig. 14), las trampas eran puestas a las 18:00 hrs y retiradas en la mañana siguiente. Inmediatamente después de colectarlos, los mosquitos fueron depositados en CO² y fueron transportados al Laboratorio de Entomología Médica, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, México.

Fig. 6.- Trampa de luz CDC, utilizando CO₂ en pellets como atrayente.



Los mosquitos fueron almacenados a -70 °C y posteriormente enviados en CO² a la universidad de Colorado, Colorado, USA donde fueron identificados y clasificados en tablas frías (chill tables) (Fig. 15) utilizando las claves de Darsie and Ward 2005, y separados en pools de 20 mosquitos hembras o machos; en el caso de *Psorophora ciliata* (Fabricius) debido a que su tamaño es 3 o 4 veces más grande en comparación con las otras especies colectadas éstas fueron separadas en pools de 4 mosquitos hembras o machos cada uno. Algunos de los especímenes estaban en malas condiciones por lo que solamente fueron identificados hasta género.

Fig. 7.- Mosquitos siendo separados mediante el uso de una plancha fría.



5.6.- RT-PCR Y SECUENCIACIÓN

Los pools fueron homogenizados dentro de tubos de propileno BD Falcon de base redonda, 5ml, tapa a presión, previamente rotulados (BD, número de catálogo 352063), conteniendo 1.75 ml de buffer MEM (CELLGRO número de catálogo: 10-010), y 4 balines de cobre. Los tubos fueron fuertemente cerrados y puestos en el vortex hasta que los mosquitos fueran completamente triturados y una mezcla fuera obtenida. Los tubos fueron centrifugados en una centrífuga en frío a 3,500 rpm por 10 minutos. El RNA supernadante fue extraído utilizando el mini kit de extracción de RNA Qiam (Qiagen, catalog number: 52906). Una vez obtenido el RNA, estándar RT-PCR fue desarrollado de acuerdo a los protocolos de Gubler et al, 2000 y Lanciotti, et al, 2000, utilizando los controles positivo y negativo apropiados. Los mosquitos del género *Culex* fueron probados con primers específicos de VON debido a que este género es el que está considerado como los vectores principales, mientras que los otros géneros colectados fueron probados con primers de Flavivirus, solo en caso de que alguno resultara positivo serían probados con los primers específicos de VON.

Los primers usados para el proceso de VON fueron: forward primer WNV 212 5'TTGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTT3', y reverse primer WNV 619c 5'CAGCCGACAGCACTGGACATTCATA3'. En el caso del PCR hacia Flavivirus fueron utilizados los siguientes primers: forward primer MAMD 5'AAC ATG ATG GGR AAR AGR GAR AA3') y reverse primer cFD2 5'GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC. Todos los productos de PCR fueron visualizados en geles de Agarosa al 1% con Bromuro de Etidio.

El DNA de los productos de las muestras positivas fue purificado utilizando el kit de extracción en gel QiAquick (Qiagen, número de catálogo: 28704); una vez obtenido el DNA, fueron secuenciados. Las mismas secuencias de los primers utilizados en el PCR de VON fueron utilizados.

5.7.- IDENTIFICACIÓN DE CX. POR VIA MOLECULAR

Una vez que el pool fue homogeneizado el DNA del supernadante fue extraído utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, número de catálogo: 69504). El PCR fue desarrollado de acuerdo al protocolo de Aspen et al, 2003, utilizando los controles positivo y negativo apropiados. Los primers utilizados fueron los siguientes forward primer PQ10 (5'CCTATGTCCGCTATACTA3'), reverse primer CP16 (5'GCGGGTACCATGCTTAAATTTAGGGGGTA3'). El producto del PCR fue visualizado en geles de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio.

6.- RESULTADOS

6.1.- MUESTREO EN CABALLOS

Se llevó a cabo un total de 7 colectas de caballos; en el año 2006 se muestreó en los municipios de Cadereyta, Montemorelos, Pesquería y Villa Juárez y en el año 2007 los municipios de Cadereyta, Pesquería, Monterrey y Santiago.

Durante el año 2006 se colectaron un total de 62 muestras en los meses de Abril, Junio y Agosto; en los municipios de Montemorelos, Villa Juárez, Cadereyta y Pesquería (tabla 3).

En el año 2007 se colectaron un total de 141 muestras durante los meses de Septiembre y Octubre en los municipios de Monterrey, Santiago, Cadereyta y Pesquería (tabla 4).

Tabla 4. Total de muestras de suero equinos colectados en el Estado de Nuevo León en el año 2006.

Localidad	No. Muestras (%)
Villa Juárez	23 (37)
Cadereyta	22 (35.5)
Pesquería	12 (19.5)
Montemorelos	5 (8)
Total	62 (100)

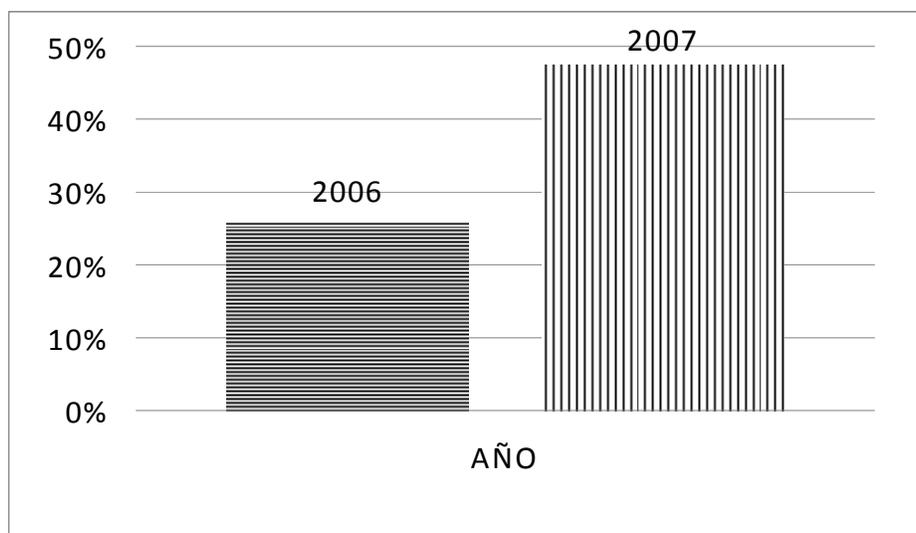
Tabla 5. Total de muestras de suero de equinos colectados en el Estado de Nuevo León, en el año 2007.

Localidad	No. Muestras (%)
Monterrey	58 (41.15)
Cadereyta	56 (39.7)
Santiago	25 (17.7)
Pesquería	2 (1.45)
Total	141 (100)

6.2.- SEROPOSITIVIDAD EN CABALLOS

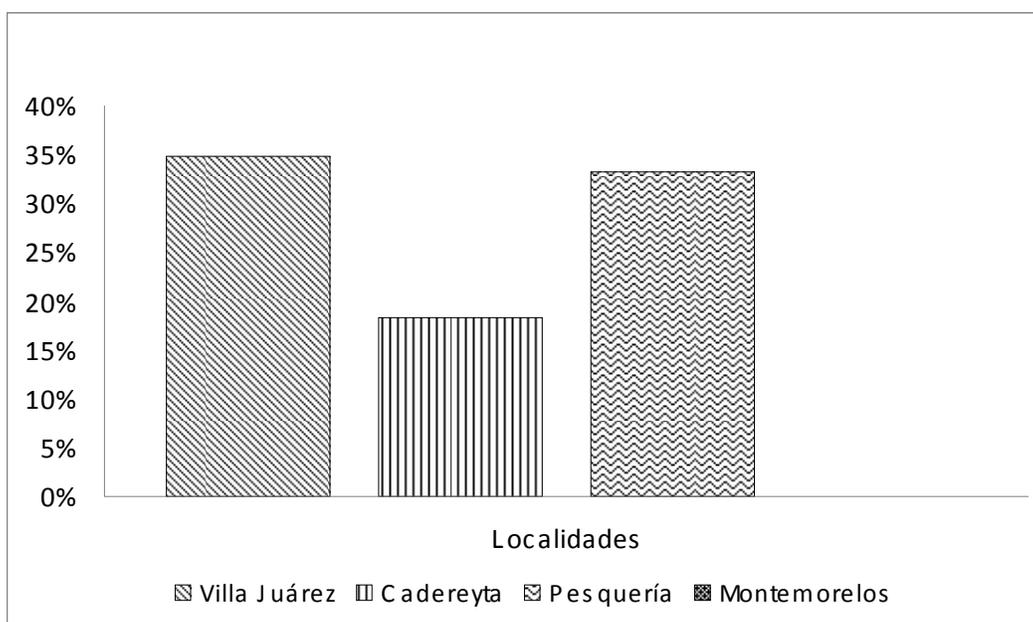
En el año 2006, de las 62 muestras tomadas 16 resultaron positivas a la prueba de ELISA de bloqueo para la detección equivaliendo a un 25.8% de seroprevalencia. Respecto al año 2007, de las 141 muestras tomadas 67 resultaron positivas a la prueba de ELISA de bloqueo, equivaliendo a un 47.5% de seroprevalencia (Fig. 8).

Fig. 8.- Seroprevalencia de equinos en el estado de Nuevo León en los años 2006 y 2007



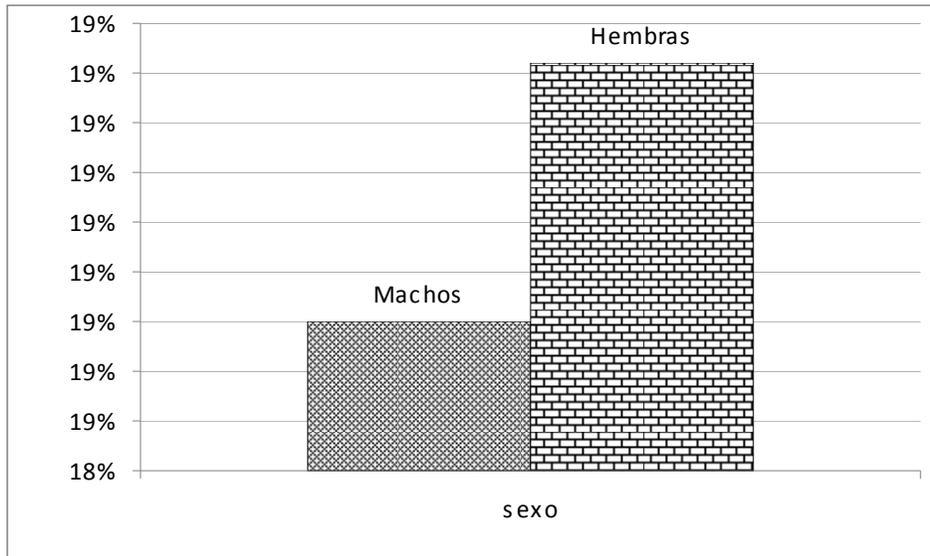
De las 62 muestras tomadas en el año 2006, 23 pertenecieron a Villa Juárez de las cuáles 8 (34.8% de seroprevalencia) resultaron positivas, 22 al municipio de Cadereyta donde 4 (18.2% de seroprevalencia) resultaron positivas, 12 al municipio de Pesquería en donde 4 (33.3% de seroprevalencia) resultaron positivas y 5 al municipio de Montemorelos de las cuales 0 fueron positivas (Fig. 9).

Fig. 9. Seroprevalencia de VON en los municipios de Villa Juárez, Cadereyta, Pesquería y Montemorelos en el año 2006



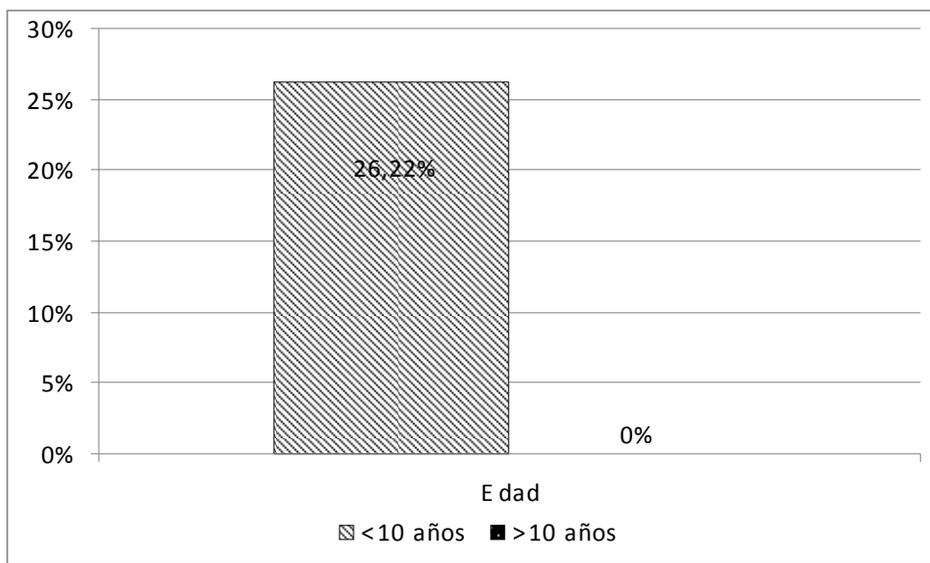
Otro factor que fue tomado en cuenta fue el sexo, de las 62 muestras colectadas en el año 2006, 37 fueron hembras de las cuales 10 (18.86% de seropositividad) resultaron positivas y 25 fueron machos de las cuales 6 (18.60% de seropositividad) resultaron positivos (Fig. 10).

Fig. 10 Seroprevalencias de VON en equinos dependiendo el sexo en el año 2006



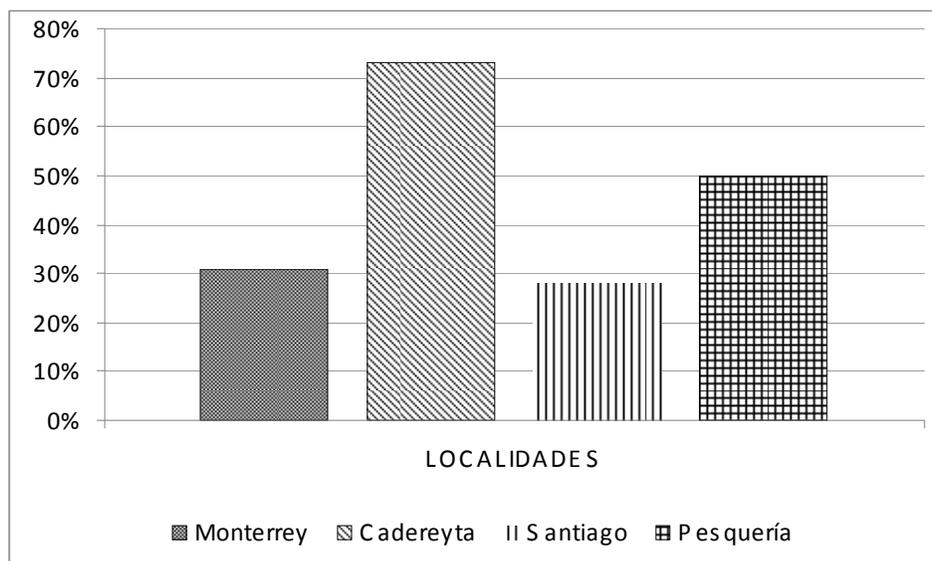
De las muestras colectadas en el año 2006, también medimos la seropositividad encontrada de acuerdo a la edad, y debido a la variación de las edades, éstas fueron agrupadas en animales <10 años y animales >10 años; siendo de las 62 muestras colectadas, 61 equinos <10 años de las cuales 16 (26.22% de seropositividad) resultaron positivas y solamente 1 >10 años de edad la cual fue negativa (Fig. 11).

Fig. 11.- Seroprevalencia de VON en equinos en el año 2006 de acuerdo a la edad.



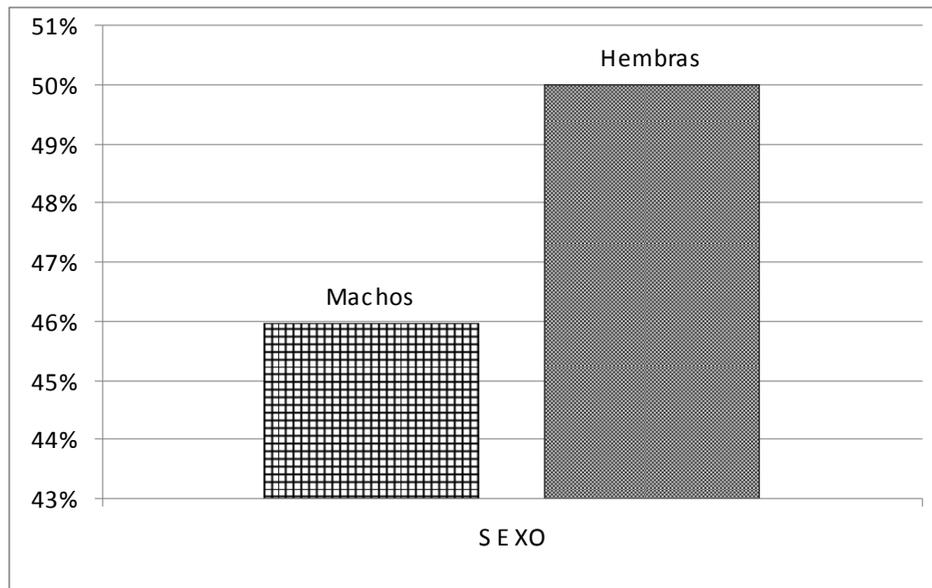
Referente al año 2007, de las 141 muestras tomadas, 58 fueron de equinos del municipio de Monterrey de las cuales 18 (31% de seroprevalencia) resultaron positivas a la prueba de ELISA de bloqueo para la detección de anticuerpos de VON, 56 pertenecieron al municipio de Cadereyta en donde 41 (73.21% de seoprevalencia) resultaron positivos a la prueba de ELISA de bloqueo a la detección de anticuerpos de VON, 25 fueron tomadas a equinos del municipio de Santiago de las cuales 7 (28% de seroprevalencia) resultaron positivas a la prueba de ELISA de bloqueo a la detección de anticuerpos de VON y 2 fueron tomadas en ejemplares del municipio de Pesquería en donde 1 (50% de seoprevalencia) resultó positivo a la prueba de ELISA de bloqueo a la detección de anticuerpos de VON (Fig. 12).

Fig. 12.- Seroprevalencia de VON en equinos en los municipios de Monterrey, Cadereyta, Santiago y Pesquería en el año 2007



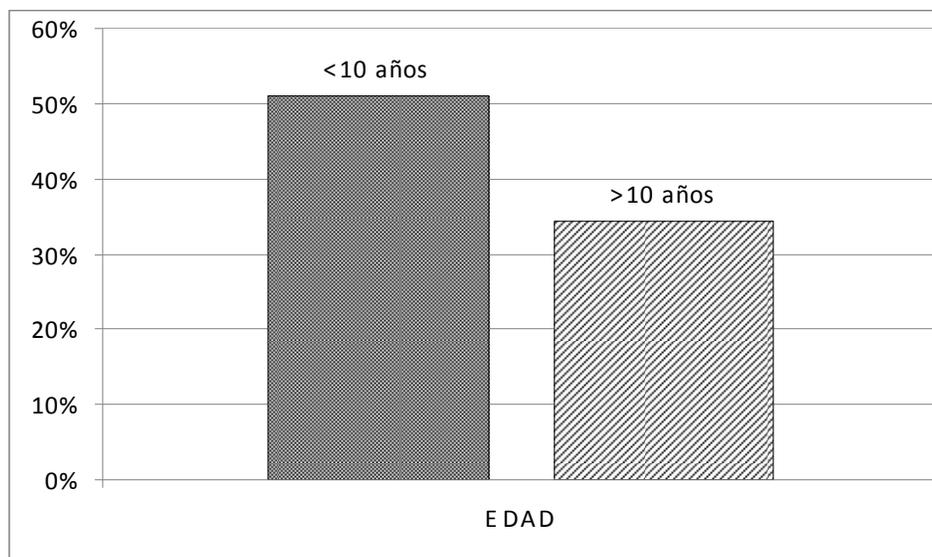
En base al sexo, de las 141 muestras colectadas en 2007, 87 fueron machos de las cuales 40 resultaron positivas (45.97% de seropositividad) y 54 fueron hembras de las cuales 27 resultaron positivas (50% de seropositividad) (Fig. 13).

Fig. 13.- Seroprevalencia de VON encontrada en equinos de acuerdo al sexo en el año 2007



Al igual que en 2006, en 2007 también se determinó la seropositividad en base a la edad (debido a que existe mucha variación en esta se agruparon animales <10 años y >10 años); de las 141 colectadas en 2007, 106 fueron < 10 años de las cuales 54(50.94% de seropositividad) resultaron positivas y 35 muestras fueron de equinos >10 años de las cuáles 12 (34.28% de seropositividad) resultaron positivas (Fig. 14).

Fig. 14.- Seroprevalencia de VON encontrada en equinos dependiendo la edad en el año 2007.



6.3.- ANÁLISIS DE DATOS

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico SAS 9.1 por medio de la prueba de Chi-Cuadrada utilizando tablas de contingencia para evaluar la dependencia de los resultados obtenidos mediante la prueba de ELISA de bloqueo con respecto a la edad y sexo. Los resultados fueron considerados significativos cuando el valor de P fue igual o menor a 0.05 ($P \leq 0.05$).

Respecto a la edad de los animales muestreados, debido a que es muy variable fueron agrupados en <10 años y >10 años; esta fue evaluada para saber si existe o no dependencia de la edad para que los animales, adquieran la infección por medio la prueba de Chi-Cuadrada utilizando tablas de contingencia, en donde se planteó lo siguiente; la hipótesis nula, H_0 , establece que no existe diferencia significativa en cuanto a la edad. En otras palabras la edad del animal es independiente a la infección. Considerando un $\alpha=0.05$, el valor p derivado del X^2 calculando para el año 2006 ($P= 0.01$) y para el 2007 ($P=0.05$) indica que se debe rechazar la H_0 , por lo que la aparición de la infección depende significativamente de la edad del animal, en las condiciones del estudio en cuestión. (Tablas 6 y 7).

Tabla 6.- Frecuencias observadas en equinos de <10 años a > 10 años, con resultados positivos o negativos del virus en el año 2006, en Nuevo León, México.

EDAD VS INFECCION %		
	<10 AÑOS	>10AÑOS
POSITIVO	25	0
NEGATIVO	75	100
total	100	100

$X^2=28.5714; P= 0.01$

Tabla 7.- Frecuencias observadas en equinos de <10 años a > 10 años, con resultados positivos o negativos del virus en el año 2007, en Nuevo León, México.

EDAD VS INFECCION %		
	<10 AÑOS	>10AÑOS
POSITIVO	51	27
NEGATIVO	49	73
total	100	100
$X^2=12.1059; P= 0.05$		

Al evaluar las variables Sexo (machos y hembras) e Infección (% de seropositividad obtenido mediante la prueba de ELISA de bloqueo) en los años 2006 y 2007, la hipótesis nula, H_0 , establece que no existe dependencia significativa en cuanto al sexo del animal. Considerando un $\alpha=0.05$, el valor P derivado del X^2 calculando para el año 2006 ($P=0.2431$) y para el 2007 ($P=0.5731$) indica que no se debe rechazar la H_0 , por lo que la aparición de la infección no depende de sexo del animal, en las condiciones del estudio en cuestión, en otras palabras se demuestra que no hay dependencia significativa y que el sexo del animal es independiente a la infección.

De igual manera fue comparada la dependencia entre los resultados obtenidos mediante la prueba de ELISA de bloqueo y el sexo de los equinos muestreados en los 2 años, no encontrándose dependencia entre la seropositividad y el sexo tanto en el año 2006 como en el 2007 (Tablas 8 y 9).

Tabla 8.- Frecuencias observadas en equinos hembras y machos y su relación con o sin infección dada por el virus, en el año 2006, en Nuevo León, México.

SEXO VS INFECCION %		
	MACHOS	HEMBRAS
POSITIVO	20	27
NEGATIVO	80	73
total	100	100
$X^2=1.3628; P= 0.2431$		

Tabla 9.- Frecuencias observadas en equinos hembras y machos y su relación con o sin infección dada por el virus, en el año 2007, en Nuevo León, México.

SEXO VS INFECCION %		
	MACHOS	HEMBRAS
POSITIVO	46	50
NEGATIVO	54	50
total	100	100
$X^2=0.3205; P= 0.5713$		

Respecto a la seropositividad encontrada en los 2 años de muestreo, los datos fueron analizados a fin de conocer si existió una diferencia significativa utilizando la prueba de proporciones, en la cual plantea lo siguiente, la hipótesis nula H_0 establece que no existe diferencia significativa en la seropositividad encontrada en los 2 años de muestreo, en donde si el valor de $Z > 1.96$ la H_0 se rechaza y existe una diferencia significativa y si el valor de $Z > 2.58$ de igual manera se rechaza la H_0 y significa que existe una alta diferencia significativa. Al evaluar los datos considerando un $\alpha=0.01$ y el valor de $Z=3.11$ se rechaza la hipótesis nula, lo que significa que si existe una diferencia significativa en la seropositividad encontrada en los años de muestreo.

6.4.- COLECTA DE MOSQUITOS

Siete mil trescientos sesenta y cinco mosquitos fueron colectados por medio de trampas de luz CDC utilizando CO₂ en pellets como atrayente durante los meses de Septiembre y Octubre de 2007, en el ejido Francisco Villa, Pesquería, representando 6 géneros y 15 especies. La especie más predominante fue *Mansonia titillans* (Walker), seguida por *Cx. quinquefasciatus*, *Culex coronator* (Dyar y Knab), *Culex erraticus* (Dyar y Knab), *Anopheles crucians* (Wiedeman), *Anopheles quadrimaculatus* (Theobald), *Aedes taeniorhynchus* (Wiedeman), *Aedes scapularis* (Rondani), *Psorophora columbiae* (Dyar y Knab), *Ps. ciliata*, *Aedes vexans* (Meigen), *Anopheles pseudopunctipennis* (Theobald), *Uranotaenia lowii* (Theobald), *Psorophora cyanescens* (Coquillett), *Aedes albopictus* (Skuse). Algunos de los mosquitos estaban en malas condiciones por lo que solo fueron clasificados como *Cx. spp.*; *An. spp.* y *Ae. spp.* respectivamente. Los 7,365 mosquitos fueron agrupados en 393 pools de acuerdo a sexo y especie (Tabla No. 10).

Fig. 15.- Especies de mosquitos capturados y porcentajes de captura.

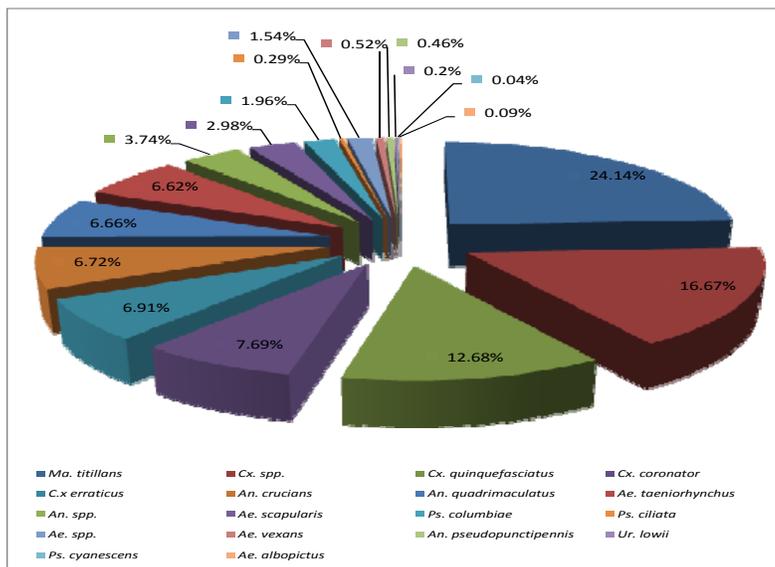


Tabla 10.- Mosquitos colectados en el ejido Francisco Villa, Pesquería, Nuevo León, México en Septiembre y Octubre de 2007, los datos presentados son No. Mosquitos capturados por especie y los No. pools procesados.

Especies	Número de Mosquitos	Número de Pools
<i>Mansonia titillans</i>	1,778	91
<i>Culex spp.</i>	1,228	62
<i>Culex quinquefasciatus</i>	934	48
<i>Culex coronator</i>	567	30
<i>Culex erraticus</i>	509	27
<i>Anopheles. crucians</i>	495	26
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	491	26
<i>Aedes taeniorhynchus</i>	488	26
<i>Anopheles spp.</i>	276	14
<i>Aedes scapularis</i>	220	12
<i>Psorophora columbiae</i>	145	9
<i>Psorophora ciliata</i>	22	7
<i>Aedes spp.</i>	114	6
<i>Aedes vexans</i>	39	3
<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	34	3
<i>Uranotaenia lowii</i>	15	1
<i>Psorophora cyanescens</i>	3	1
<i>Aedes albopictus</i>	7	1
Total	7,365	393

6.4.1.- MOSQUITOS POSITIVOS

De los 7365 mosquitos colectados agrupados en 393 pools de acuerdo a especie y sexo, los cuáles fueron procesados por medio de la prueba de RT-PCR.

Tres mil doscientos treinta y ocho mosquitos correspondieron al género *Culex*, los cuáles fueron agrupados en 167 pools que correspondieron a 4 especies (*Cx. spp* n= 1228, *Cx. quinquefasciatus* n= 934, *Cx. coronator* n= 567 y *Cx. erraticus* n= 509) las cuáles fueron analizadas por medio de la prueba de RT-PCR utilizando primers específicos de VON debido a que es el género que está reportado como el principal vector de VON.

Virus del Oeste del Nilo fue detectado en 2 pools (Fig. 19) del género *Culex* los cuáles fueron identificados como *Cx. spp.* debido a la mala condición de los especímenes. Se calculó el rango mínimo de infección (MIR) siendo 0.61.

Fig.16 .- Mosquito *Cx. quinquefasciatus* principal vector de VON en México.



Fig. 17.- Mosquito *Cx. erraticus*, vector de VON reportado en USA.



Fig.18.- Mosquito *Cx. coronator*, vector reportado como positivo a VON en USA.



Cuatro mil ciento veintisiete mosquitos correspondieron a 5 géneros y 11 especies (*Ma. titillans* n=1,778, *An. crucians* n=495, *An. quadrimaculatus* n=491, *Ae. taeniorhynchus* n= 488, *Ae. scapularis* n=220, *Ps. columbiae* n=145, *Ae. vexans* n=39, *An. pseudopunctipennis* n=34, *Ps. ciliata* n=22, *Ur. lowii* n= 15, *Ae. albopictus* n=7 y *Ps. cyanescens* n=3) los cuáles fueron agrupados en 226 pools; estos pools fueron analizados con la prueba de RT-PCR utilizando primers de Flavivirus, solo en caso de que alguno resultara positivo serían procesados utilizando primers específicos de VON, todos los pools resultaron negativos.

Fig.19.- Fotografía del Gel de Agarosa con 1% de bromuro de etidio en donde se puede observar el resultado de los Pools positivos junto con los controles positivo y negativo



El DNA producto de los pools positivos fue purificado utilizando using QiAquick Gel Extraction Kit, (Qiagen, número de catálogo: 28704) y secuenciado. Los mismo primers utilizados en el PCR de VON fueron usados para secuenciar las reacciones.

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR (números de acceso de GenBank # GQ862373 y GQ862374), fueron analizadas en el programa Blast 2.2.2.1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> y revelaron ser idénticos a las regiones homólogas de aislamientos múltiples tanto de los genotipos NY99 y WN02, debido a lo cual no se pudo identificar el genotipo de VON responsable de estas infecciones.

6.4.2 IDENTIFICACIÓN CX. POR PCR

Los 2 pools positivos fueron analizados mediante el PCR del complejo *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens pipiens* y *Cx. pipiens quinquefasciatus*) de acuerdo al protocolo de Aspen, 2003; ambos pools resultaron negativos (Fig. 20) al complejo *Cx. pipiens*. Sin embargo en el período de colecta fueron colectadas 3 especies del género *Culex* (*Cx. quinquefasciatus*, *Cx. coronator* y *Cx. erraticus*) y todas ellas han sido reportadas como vectores de VON en USA.

Fig. 20.- Fotografía del gel de Agarosa con 1% de bromuro de etidio en donde se pueden observar el resultado de los pools negativos al PCR del complejo *Cx. pipiens*.



7.- DISCUSIÓN

Durante el período del estudio en los años 2006 y 2007, 7 colectas fueron realizadas en 6 diferentes municipios; los cuáles comprenden parte de la zona metropolitana de Monterrey y la región Periférica.

Se colectó un total de 203 muestras de equinos, de las cuales 62 fueron colectadas en el año 2006 y 141 en el 2007.

De las 62 muestras colectadas en el año 2006, 16 resultaron positivas a la prueba de ELISA de bloqueo equivaliendo a un 25.80%, este resultado es similar al reportado por Cruz et al., 2005 en un estudio realizado en El Salvador, en donde reportan un 25% de seropositividad en equinos, por el lado contrario es un porcentaje de seropositividad alto comparado con lo reportado por Pupo et al., 2006 en un estudio en Cuba en donde reporta un 1.90% de seropositividad.

De igual manera comparándolo con resultados reportados de estudios realizados en México, resulta ser alto comparado con lo reportado por Loroño et al., 2003 en un estudio realizado en Yucatán en donde encontraron un 1.2% de seropositividad, situación contraria a lo reportado por Blitvich et al., en 2003 y Alonso-Padilla et al., 2009, en donde reporta un 62.5% de seropositividad en el estado de Coahuila y 53% en el estado de Chiapas, respectivamente.

Respecto al año 2007 se colectó un total de 141 muestras, en donde 67 resultaron positivas equivaliendo a un 47.51% de seropositividad, este resultado es alto comparado con lo reportado por Cruz et al., 2005 y por Pupo et al., en el 2006. Comparando con estudios realizados en México resulta ser similar a lo reportado por Blitvich et al., 2003 y Alonso-Padilla et al., en 2009; siendo contrario a lo reportado por Loroño-Piño et al., 2003.

De las 203 muestras colectadas en los 2 años de muestreo se encontró una seropositividad a VON similar tanto en machos como en hembras siendo 18.86% y 18.60% para el 2006 y 45.97% y 50% para el 2007 respectivamente, datos que no son reportados en trabajos hechos con anterioridad.

Otro factor considerado fue la edad de la cual también se determinó la seropositividad dependiendo de ella. Debido a que la edad de los animales muestreados fue muy variante estos fueron agrupados en animales <10 años y animales >10 años;

encontrándose una mayor seropositividad en los animales que fueron <10 años datos que no se pueden comparar con trabajos hechos anteriormente ya que no son reportados.

Al buscar una dependencia entre las variables del presente estudio, en cuanto si existe una dependencia entre ellas (edad y sexo) con los resultados obtenidos mediante la prueba de ELISA de bloqueo, se llevó a cabo el análisis de los datos mediante el programa estadístico SAS 9.1, por medio de la prueba de Chi-Cuadrada utilizando tablas de contingencia, se pudo observar que existe una dependencia de la seropositividad con la edad siendo los animales <10 años los más susceptibles, caso contrario lo que sucede con el sexo en donde no se encontró una dependencia de la seropositividad,.

Se analizó la seropositividad encontrada en los 2 años de muestreo por medio de la prueba de Proporción en donde se obtuvo un valor de $Z=3.11$ significando que existe una alta diferencia significativa entre la seropositividad encontrada en los 2 años de muestreo.

En el presente trabajo se colectó un total de 7,365 siendo la especie más predominante fue *Mansonia titillans* con un 24.14% y *Psorophora cyanescens* la especie con menor porcentaje de captura con un 0.04%. El 21.95% de los mosquitos colectados fueron clasificados como *Cx. spp*; *An. spp* y *Ae. spp*. respectivamente. Todos los ejemplares fueron colectados mediante trampas de luz CDC utilizando CO₂ como atrayente que es el método de colecta preferentemente utilizado tal como lo reportan Nasci , *et al.*, 2001, Reisen , *et al.*, 2004, Tesh, *et al.*, 2004; Yaremych, *et al.*, 2004.

Del 21.95% de los mosquitos colectados, los cuáles no pudieron ser identificados debidos a su condición, se detectó VON en 2 pools de mosquitos los cuáles fueron identificados como *Cx. spp.*; estos pools fueron analizados mediante la prueba de PCR para el complejo *Cx. pipiens* resultando ambos negativos empero dentro de las especies del género *Cx.* colectadas se encuentran 2 especies más que fueron *Cx. coronator* y *Cx. erraticus* y ambas son especies que ya han sido encontradas positivas a VON en USA; *Cx. coronator* en el año de 2002 y *Cx. erraticus* en el año de 2003 como lo reporta el CDC (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/mosquitoSpecies.htm#99>) así también Ulloa et al, 2009 y Medina et al., 2008 reportan otras especies de *Culex* positivas a Von en México, encontrado VON en *Culex nigripalpus* y *Culex interrogator* en el estado de Chiapas y en *Cx. tarsalis* en Baja California México respectivamente.

Sin embargo en el estado de Nuevo León, México solo *Cx. quinquefasciatus* ha sido reportado infectado con VON como lo reporta Elizondo et al., 2005, el cuál encontró un pool de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* infectado con VON, y de igual manera para el estado de Tabasco, México, es la única especie que ha sido encontrada positiva a VON como lo reporta Hidalgo et al., 2008 en un pool de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* positivos a VON colectados en un zoológico.

El porcentaje de infectividad fue de 0.54%, el cuál es muy similar a lo encontrado por Elizondo et al., 2005 en un trabajo realizado en la misma localidad.

De los 3238 mosquitos *Culex* colectados solo 2 pools de 20 mosquitos cada uno resultaron positivos correspondiendo a un 0.54% concordando con Elizondo et al., 2005 que encontró 0.42% grupo de mosquitos hembras de *Cx. quinquefasciatus*, positivo a VON; ambos trabajos fueron realizados en el estado de Nuevo León, México y los porcentajes encontrados son mayores a los reportados 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) encontró de positividad el (3.36%) en Illinois, el porcentaje más alto lo reporta Kulasekera, et al., (2001), y fue de 13.54% de 967 grupos (24,068 mosquitos) en New York.

Los dos pools de mosquitos *Cx. spp.* que fueron encontrados positivos a VON, fueron secuenciados (números de acceso de GenBank # GQ862373 y GQ862374); ambas secuencias al ser comparadas en el programa Blast 2.2.2.1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> revelaron ser idénticos a las regiones homólogas de aislamientos múltiples tanto de los genotipos NY99 y WN02 motivo por el cual no se pudo identificar el genotipo de VON responsable de estas infecciones, a diferencia de David et al., 2004, que encontró diferencias de nucleótidos al comparar la cepa VON TM171-03 con la cepa NY99, así también Elizondo et al., 2005 en el aislamiento logrado en un pool de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* al compararla con previos aislamientos logrados en México encontró diferencias en los nucleótidos de las secuencias comparadas.

8.- CONCLUSIONES

1.- Se comprobó la presencia de VON encontrándose una seropositividad de 25.80% para el año 2006 y de 47.51% de seropositividad para el año 2007 en equinos en todas las localidades muestreadas. Siendo las localidades de Juárez en el 2006 y Cadereyta en el 2007 las que tuvieron un mayor porcentaje de seropositividad con un 34.8% y 73.21% de seropositividad.

2.- Al analizar las dependencias de VON con respecto a la edad y el sexo, de acuerdo a los resultados obtenidos por medio de la prueba de Chi-Cuadrada se encontró dependencia entre la edad y la infección, siendo los equinos <10 años los más; mientras que respecto al sexo los resultados demuestran que no existe dependencia con la infección lo que significa que tanto machos como hembras son igual de susceptibles.

3.- Referente a los años de muestreo se encontró una alta diferencia significativa en las seropositividades encontradas de acuerdo a los resultados obtenidos por medio de la prueba de proporciones.

4.- Se colectaron utilizando la trampa de luz CDC con CO² como atrayente un total de 7,365 mosquitos representando 6 géneros y 15 especies los cuáles fueron agrupados en 393 pools, siendo *Ma. titillans* la especie con mayor número de ejemplares y *Ps. cyanescens* la especie menos colectada con un 24.14% y 0.04% respectivamente.

5.- Se colectaron 3 especies del género *Culex* género que está reconocido como el principal vector del patógeno, los cuales fueron *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. coronator* y *Cx. erraticus*; todas las especies anteriormente mencionadas han sido reportadas como positivas a VON en otros países.

5.- Se reporta 2 pools de mosquitos positivos a VON, que debido a su mala condición física fueron identificados como *Cx. spp.*, se realizó un PCR para especie para identificar por vía molecular si pertenecían al complejo *Cx. pipiens* (que abarca *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*); ambos pools resultaron negativos.

6.- En este estudio también se colectaron otras especies del género *Culex* las cuáles son *Cx. erraticus* y *Cx. coronator*, y ambas especies han sido reportadas como vectores de VON en USA, sin embargo no pudieron identificarse por vía molecular debido a que no existen los primers específicos de especie para dicha prueba; por lo que cabe mencionar que pueden existir otras especies de mosquitos que estén jugando un papel importante en la transmisión de la enfermedad y que hasta el momento siguen siendo desconocidos.

7.- Se obtuvo la secuencia de VON de los 2 pools que resultaron positivos, la cual al ser comparada con otras secuencias mediante el programa Blast 2.2.2.1 revelaron ser idénticos a las regiones homólogas de aislamientos múltiples tanto de los genotipos NY99 y WN02, debido a lo cual no se pudo identificar el genotipo de VON responsable de estas infecciones.

9.- LITERATURA CITADA

- AAM. Boletín No. 143. El virus del Nilo Occidental (2000) http://www.drweb.comar/aam/bolI43/143_11.htm.
- 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.
- Aranda, R. Escosa, E. Marqués y A. Tenorio (2003) virus west nile Revisión, métodos de Vigilancia y recomendaciones de respuesta y control
- Birdnature, 2002. North American Migration Flyways. <http://www.birdnature.com/flyways.html>.
- Blitvich BJ, Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF, Marlenee NL, González-Rojas JI, Komar N, Gubler DJ, Calisher CH and Beaty BJ. (2003) Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 9(7), 853-856.
- Blitvich B., Fernández-Salas I., Contreras-Cordero J., Loroño-Pino M., Marlenee N., Díaz F., González-Rojas J, Obregón-Martínez N, Chiu-García J., Black IV W., and Beaty B. (2004) Phylogenetic Analysis of West Nile Virus, Nuevo Leon State, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. 10(7):1314-1317.
- Brinton M. (2002). The molecular biology of West Nile Virus: A new invader of the Western Hemisphere. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002. 56:371–402
- Bunning M., Bowen R., Bruce C., Sullivan K., Davis b., Komar N, Godsey M, Baker D., Hettler D., Holmes D, Biggerstaff B. and Mitchell C. (2002) Experimental Infection of Horses With West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*. 8(4): 380-386.

- Campbell G, Marfin A, Lanciotti R and Gubler D (2002) West Nile virus. *The lancet Infectious Disease*. 2: 519-529.
- Cantile, C., DiGuardo, G., Eleni, C., and Arispici, M. (2000). Clinical and neurological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet. J.* 32:31–35
- Carrada Bravo Teodoro (2004) Encefalitis por virus Nilo-Oeste: Epidemiología, ecología, diagnóstico y prevención. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 51(1): 6-15.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1999 a. Update: West-Nile-like viral encephalitis-New York, 1999. *MMWR. Wkly Rep.* 48: 890-892.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1999 b. Outbreak of West-Nile-like viral encephalitis-New York, 1999. *MMWR. Wkly Rep.* 48: 845-849.
- Center for Disease Control and Prevention. (2003). <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/>
- Center for Disease Control and Prevention.(2004). Antecedentes: Historia y Distribución del Virus del Oeste del Nilo. *Boletín Informativo*.
- Clements, A. N. 1999. *The Biology of Mosquitoes*. Vol. 2 (Sensory reception and Behaviour). CABI Publishing. United Kingdom. pp. 458-539.
- Cruz L, Cardenas VM, Abarca M, Rodriguez T, Reyna RF, Serpas MV, Fontaine RE, Beasley DW, Da Rosa AP, Weaver SC, Tesh RB, Powers AM, Suarez-Rangel G. Short Report: Serological evidence of west Nile virus activity in El Salvador. *Am J Trop Med and Hyg* 2005; 72:612-615.
- Darsie Richard F., Ward Ronald A. (2005) Identification and Geographical Distributions of the mosquitoes of North America, north of Mexico. *University Press of Florida, Gainesville, FL*.

- 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 temperature 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 transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 39 (4): 640-644.
- Dupuis II, A.P., Marra, P., Kramer, L.D., (2003). Serological evidence of West Nile virus transmission, Jamaica, West Indies. *Emerging Infect. Dis.* 9, 860– 863.
- Eidson, M. N. Komar, F. Sorhage, R. Nelson, T. Talbot, F. Mostashari, et al. 2001. Crow deaths as a sentinel surveillance system for West Nile virus in the northeastern United States, 1999. *Emerg Infect Dis.* 7:615-20.
- Elizondo Quiroga D., Davis CT, Fernández-Salas I, Escobar-López R, Velasco-Olmos D, Soto-Gastalum LC, Aviles-Acosta M, Elizondo-Quiroga A, González Rojas JI, Contreras-Cordero JF, Guzman H, Travassos da Rosa A, Blitvich BJ, Barreth A, Beaty BJ and Tesh R. (2005) West Nile virus isolation in human and mosquitoes, México. *Emerging Infectious Diseases*, **11**(9), 1449-1452.
- Epstein PR. 2000. Is global warming harmful to health? *Sci Am* 283:50-7.
- 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., Weaver, S.C., (2003). West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerging Infect. Dis.* 9, 1604–1607.

Fernández S., I. 1999. *Biología y Control de Aedes aegypti*. Manual de Operaciones. Editorial Universidad Autónoma de Nuevo León., México

Fundación Mundo Sano. (2002). Vectores. Informativo Digital de Fundación Mundo Sano sobre enfermedades de transmisión vectorial. 1(2): 3-6.

Galvan R., Lurie S., Rene A., Bae S., Singh K., Gonzalez A. (2005) An Analytical Study of the Perceptions, Prevention Strategies, Treatment and Economic Impact of Equine West Nile Virus. *TPHA Journal*. 57(2): 3-13.

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.

Gould L. Hannah and Fikrig Erol (2004) West Nile virus: a growing concern?. *The Journal of Clinical Investigation*. 113 (8): 1102-1107.

Gubler DJ, Reiter P, Ebi KL, Yap W, Nasci R, Patz JA. 2001. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environ Health Persp* 109 Suppl 2:223-33.

Hall, R.A., Broom, A.K., Smith, D.W., Mackenzie, J.S., (2002). The ecology and epidemiology of Kunjin virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 267, 253– 269.

Hidalgo-Martínez Ana, Puerto Fernando I, Farfán-Ale José Arturo, García-Rejón Julián E, Rosado-Paredes Elsy del P, Méndez-Galván Jorge, Figueroa-Ocampo Raymunda, Takashima Ikuo, Ramos Celso. (2008) Prevalencia de infección por el virus del Nilo occidental en dos zoológicos del estado de Tabasco. *Salud Pública de México*. 50(1): 76-85.

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): 1-1.

- Karoly DJ, Braganza K, Stott PA, Arblaster JM, Meehl GA, Broccoli AJ, Dixon KW. 2003. Detection of a human influence on North American climate. *Science* 302:1200-3.
- Komar, N. (2003). West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res.* 61:185-234.
- Komar N. 2000. West Nile virus encephalitis. *Rev Sci Tech.* 19: 166-176.
- Kulasekera, V. L., L. Kramer, R. S. Nasci, F. Mostashari, B. Cherry, S. C. Troock, 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.
- Lanciotti, R.S., Roehrig, J.T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., 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., Gubler, D.J., (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern US. *Science* 286, 2333–2337.
- Lanciotti, R. S., Ebel G. D., Deubel V., Kerst A.J., Murri S., Meyer R., Rowen M., McKinney N., Morrill W. E., Crabtree M. B., Kramer L. D.; 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(1):96-105.
- Lefrancois T, Blitvich BJ, Pradel J, Molia S, Vachiery N, Pallavicini G, Marlenee NL, Zietsra S, Petitclerc M, Martinez D. (2005) West Nile virus surveillance, Guadeloupe, 2003-2004. *Emerg Infect Dis.* 7:1100-3.
- Loehle C. 2004. Climate change: detection and attribution of trends from long-term geologic data. *Ecol Model* 171:433-50.

- Medina G, Sandoval E, Rentería TB, López G, De la Mora A, Pujol L. (2008) West Nile Virus detection by RT-PCR from mosquitoes in a locality of Baja California, Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiology*; 50(3), 83-86
- Morales-Betoulle, ME, Morales, H, Blitvich, BJ, Powers, AM, et al.(2006) West Nile virus in horses, Guatemala. *Emerg Infect Dis* . 12:1038–1039.
- Murgue, B., Zeller, H., Duebel, V., (2002). The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe, and Asia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 267, 195– 21.
- 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 RS, Savage HM, White DF, Miller JR, Cropp BC, Godsey MS, et al. (2001) West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis.* 7(4): 626-630.
- Nasci, R. S, Komar, N., Marfin, A.A., Ludwig, G.V., Kramer, L.D., Daniels, T.J., Falco, R.C. , Campbell,S.R., Brookes, K., Gottfried, K.L., Burkhalter, K.L., Aspen,S.E., Kerst, A.J., Lanciotti, R.S., and C.G. Moore.(2002). Detection of West Nile virus-infected mosquitoes and seropositive juvenile birds in the vicinity of virus-positive dead birds. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol 67, Issue 5, 492-496
- 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.

Olberg R., Barker I., Crawshaw G., Bertelsen M., Drebot M., Andonova M. (2004) West Nile Virus Encephalitis in a Barbary Macaque (*Macaca sylvanus*). *Emerging Infectious Disease*. 10: 712-714.

Organización Panamericana de la Salud. 2003. Informe de la IV reunión de la red de Vigilancia de las enfermedades emergentes y reemergentes del cono sur. Santiago Chile

Ostlund E., Crom R., Pedersen D., Johnson D, Williams O., and Schmitt B. (2001) Equine West Nile Encephalitis, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 7(4): 665-669.

PAHO. 2001. Virus del Nilo Occidental en las Américas 2001 (En Línea) Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/sha/be-v2ln4-nilo.htm> (2002, Enero, 10)

Patz JA, Martens WJM, Focks DA, Jetten TH. 1998. Dengue fever epidemic potential as projected by general circulation models of global climate change. *Environ Health Persp* 106:147-53.

Peña José, Berrocal Luís, González Marco, Ponce César, Ariza Katuska, Máttar Salim. (2005). Virus del oeste del nilo: perspectivas en el mundo vertebrado. *MVZ-Córdoba* 2005; 10:(2), 593-601.

Petersen Lyle, Roehrig Jhon (2001) West Nile Virus: A Reemerging Global Pathogen. *Emerging infectious disease*. 7(4): 611-614.

Porter M., Long M., Getman L.; Giguère S., MacKay R., Lester G., Alleman R, Wamsley H., Franklin R., Jacks S, Buergelt C., Detrisac C. (2003) West Nile Virus encephalomyelitis in horses: 46 cases (2001). *JAVMA*. 222(9): 1241-1247.

Promed Mail. 2003. <http://www.promedmail.org>

Prow N., Khromykh A., and Hall R. (2009) West Nile virus: the current climate. *MLO journal*. www.mlo-online.com. Abril. 12-15.

- Pupo M., Guzmán M, Fernández R., Llop A., Dickinson F, Pérez D., Cruz R., González T., Estévez G., González H., Santos P., Kourí G., Andonova M., Lindsay R., Artsob H., and Drebot M. (2006). ¶ West Nile Virus Infection in Humans and Horses, Cuba. *Emerging Infectious Diseases*. 12(6):1022-1024.
- Quirin R., Salas M., Zientara S., Zeller H., Labie J., Murri S., Lefrancois T., Petitclerc M. and Martínez D. (2004) West Nile Virus, Guadeloupe. *Emerging Infectious Disease*. 10: 706-708.
- 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.
- Reed Kurt D., Meece Jennifer K., Henkel James S., Shukla Sanjay K. (2003) Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clinical Medicine and Research*. 1 (1): 5-12.
- 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.
- Rey J., Rutledge C. (2001). Riesgo y Prevención del Virus del Nilo Occidental en Caballos en Florida. University of Florida
- Rodas Juan (2002). Virus Emergentes y herramientas para su estudio molecular. *Rev. Col. Cienc. Pec*. 15(3): 342-355.
- RTV. Virus del Nilo Occidental (2000) http://bvs.sld.cu/uats/rtv_files/rtvl000 (2002, Enero, 10)
- Sampathkumar P. (2003) West Nile virus: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and prevention. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 1137-1144

- 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.
- Secretaría de Salud. 2002. Virus del Nilo. Relaciones Filogenéticas de los aislamientos del Virus del Nilo en África del Sur. *Epidemiología.* 50(19).
- Shope R. 1991. Global climate change and infectious diseases. *Environ Health Persp* 96:171-4.
- Shroyer, D. A. 1990. Venereal Transmission of St. Louis Encephalitis virus by *Culex quinquefasciatus* males (Diptera:Culicidae). *J. med . Entomol.* 27 (3): 334- 337.
- Snook CS, Hyman SS, Del Piero F, Palmer JE, Ostlund EN, Barr BS, Desrochers AM, Reilly LK.(2001) West Nile virus encephalomyelitis in eight horses. *J Am Vet Med Assoc.* 218:1576-1579
- Steele, K. E., M. J. Linn, R. J. Schoepp, N. Komar, T. W. Geisbert, R. M. Manduca, et al. (2000). Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York city, New York. *Vet Pathol.* 37: 208-224.
- Steinman, A., Banet, C., Sutton, G. A., Yadin, H., Hadar, S., and Brill, A. (2002). Clinical signs of West Nile virus encephalomyelitis in horses during the outbreak in Israel in 2000. *Vet. Rec.* 151:47-49
- Stenseth NC, Mysterud A, Ottersen G, Hurrell JW, Chan KS, Lima M. 2002. Ecological effects of climate fluctuations. *Science* 297:1292-6.
- Tanner J., Traub-Dargatz J, Hill A., Van Campen H, Knight A., Cunningham W., Salman. (2006). Evaluation of factors associated with positive IgM capture ELISA results in equines with clinical signs compatible with West Nile virus infection: 1,017 cases (2003). *JAVMA,* 228(3): 414-421.

Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, Rizk F. A study of ecology of the West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 1956;5:579-620.

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.

Tett SFB, Jones GS, Stott PA, Hill DC, Mitchell JFB, Allen MR, Ingram WJ, Johns TC, Johnson CE, Jones A, Roberts DL, Sexton DMH, Woodage MJ. 2002. Estimation of natural and anthropogenic contributions to twentieth century temperature change. *J Geophys Res* 107 (D16).

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.

Ulloa A., Hann Ferguson H, Méndez-Sánchez J, Danis-Lozano R, Casas-Martínez M, Guillermo Bond J, García-Zebadúa J, Orozco-Bonilla A, Juárez-Ordaz J, Farfan-Ale J, García-Rejón J, Rosado-Paredes E, Edwards E, Komar N, Hassan K. Hassan, Unnasch T, and Rodríguez-Pérez M. (2009) West Nile virus activity in mosquitoes and domestic animals in Chiapas, México. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases. In press.*

Valles X., Sánchez F. (2000) West Nile Virus: el virus de la Fiebre del Oeste del Nilo. *Enf. Emerg.* 2(4): 232-238.

Washington State University (2003) El Virus del Nilo Occidental. Public Health.

X.Y. Jia, T. Briese, I. Jordan, A. Rambaut, H. C. Chi, J. S. Mackenzie, R. A. Hall, J. Scherret, W. I. Lipkin (1999). Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *Lancet.* 354: 1971-1972

Yaremych, S. A., R. E. WRNAer, 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-.

Zeller H. West Nile Virus: An Overview of Its Spread in Europe and the Mediterranean basin in Contrast to Its Spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2004); 23:147-156.

RESUMEN CURRICULAR

M.V.Z. Luis Arturo Ibarra Juárez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Entomología Médica

Tesis: VIGILANCIA DE VIRUS DEL OESTE DEL NILO (VON) EN LOS AÑOS 2006 Y 2007 EN EL ESTADO DE NUEVO LEON, MÉXICO

Campo de Estudio: Entomología Médica.

Datos Personales: Nacido en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas el 18 de Mayo de 1978, hijo de José Ángel Ibarra Mejía y Elvia Juárez Robledo.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Chiapas, grado obtenido Médico Veterinario Zootecnista en el año 2001.

Experiencia profesional:

Biotécnico III en el departamento de Desarrollo de Métodos de la Comisión México Americana para la Erradicación del Gusano Barrenador en Chiapa de Corzo, Chiapas, de Marzo de 2001 a Enero de 2004.

Asistente de investigación en el Departamento de Entomología Médica de la Facultad de Biología desde Enero del año 2004.

Estancia de Investigación en Colorado State University en Fort Collins, Colorado, USA, de Abril de 2007 a Abril de 2008.

ARTÍCULOS PUBLICADOS