

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**MONITOREO DE AVES MIGRATORIAS ACUÁTICAS PARA LA  
DETECCIÓN DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO, EN EL ESTADO  
DE DURANGO.**

**POR:**

**ANTIOCO CIENFUEGOS SALGADO**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER ÉL TITULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.**

**JUNIO DE 2004**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**MONITOREO DE AVES MIGRATORIAS ACUÁTICAS PARA LA  
DETECCIÓN DE VIRUS DEL OESTE DEL NILO, EN EL ESTADO DE  
DURANGO**

**POR:**

**ANTIOCO CIENFUEGOS SALGADO**

**ASESOR PRINCIPAL:  
M.V.Z. ERNESTO MARTINES ARANDA**

**ASESORES COLABORADORES:  
M.V.Z. JOSE LUIS GÜEMES JIMÉNEZ  
M.V.Z. JORGE BRETÓN**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**ANTIOCO CIENFUEGOS SALGADO**

**ASESOR PRINCIPAL:**

**M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**Tesis**

**MONITOREO DE AVES MIGRATORIAS ACUÁTICAS PARA LA  
DETECCIÓN DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO, EN EL ESTADO  
DE DURANGO.**

**APROBADO POR EL COMITÉ PARTICULAR DE  
ASESORÍA**

**PRESIDENTE DEL JURADO**



---

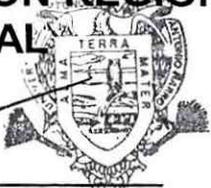
**M.V.Z. ERNESTO MARTINEZ ARANDA**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL  
DE CIENCIA ANIMAL**



---

**M.V.Z. ERNESTO MARTINEZ ARANDA**



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal  
UAAAN - UL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**MONITOREO DE AVES MIGRATORIAS ACUÁTICAS PARA LA  
DETECCIÓN DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO, EN EL ESTADO  
DE DURANGO.**



---

**M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA**

**PRESIDENTE**



---

**M.V.Z. JOSÉ LUIS GÚEMEZ JIMÉNEZ**

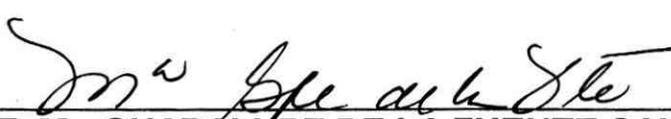
**VOCAL**



---

**M.V.Z. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS**

**VOCAL**



---

**M.V.Z. Ma GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO**  
**VOCAL SUPLENTE**

# **AGRADECIMIENTOS**

## **A DIOS**

POR BRINDARME ESA FUERZA INTERNA QUE ME HA GUIADO  
SIEMPRE

## **UAAAN-UL**

POR EL APOYO Y OPORTUNIDAD DE FORMARME  
PROFESIONALMENTE, SIEMPRE ESTARA EN MI CORAZÓN

## **COECYT**

POR LA CONFIANZA Y EL APOYO ECONÓMICO A TRAVEZ DE SU  
PROGRAMA DE BECAS TESIS 2004

## **ASESORES**

MVZ ERNESTO MARTINEZ ARANDA, MVZ JOSE LUIS GÜEMES  
JIMÉNEZ, MVZ JORGE BRETON, POR SU GRAN AYUDA Y POR  
BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR ESTE TRABAJO DE  
INVESTIGACIÓN, Y LA AMISTAD Y CONFIANZA QUE ME  
BRINDARON.

## **JURADO**

POR SUS SUGERENCIAS, OBSERVACIONES Y CORRECCIONES  
EN LA REVISIÓN DE ESTE TRABAJO, A TODOS MUCHAS  
GRACIAS.

# DEDICATORIAS

## **A MI FAMILIA:**

CIENFUEGOS SALGADO, POR SU FORTALEZA Y CONFIANZA QUE SIEMPRE HAN SABIDO BRINDARME SIN IMPORTAR LAS ADVERSIDADES

## **A MIS PADRES:**

ANTIOCO CIENFUEGOS SÁNCHEZ Y Ma DEL CARMEN SALGADO MARCHÁN, POR HABER BRINDADO EL MEJOR AMOR, CARIÑO, CONFIANZA, EJEMPLO Y APOYO INIGULABLE E INCONDICIONAL, SIEMPRE ESTARAN EN MI CORAZÓN, GRACIAS.

## **MIS HERMANOS:**

DAVID, OSWALDO, MÓNICA Y MARGARITA, POR CADA SEGUNDO QUE HEMOS VIVIDO JUNTOS Y POR AQUELLOS BUENOS Y MALOS MOMENTOS QUE VENDRAN, POR SU APOYO Y CONFIANZA, POR PERMANECER FIRMES SIEMPRE Y DEMOSTRAR QUE DARSE POR VENCIDOS NO ES UNA OPCCIÓN.

## **A MI ESPOSA E HIJO**

BELEM JOHANA ACOSTA BARRIENTOS Y ALAN LEONARDO CIENFUEGOS ACOSTA, POR TODO EL AMOR Y APOYO QUE ME HAN BRINDADO, Y POR SER UNA RAZONES MÁS IMPORTANTES PARA SER MEJOR EN LA VIDA.

## **A MIS ABUELOS**

POR SER COMPAÑEROS EN MI INFANCIA PERO SOBRE TODO POR DARME LOS MEJORES PADRES DEL MUNDO, GRACIAS.

## **A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS**

POR ESTOS LA ETAPA DE MI VIDA MAS EXTRAORDINARIA, EN ESPECIAL SRA. NINFA, SRA CARMEN, EDGAR, SOCORRO, SALOMÓN, ALVIN, VICENTE, FERCANO, YESENIA, Y TODOS MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS, GRACIAS.

## **A TODA LA GENTE**

POR TODAS LAS BUENAS ACCIONES E INTENCIONES, CONSEJOS, CRÍTICAS, OBSERVACIONES, PARA CONMIGO, GRACIAS, SIEMPRE SERÁN ÚTILES Y SIEMPRE ESTARÉ EN DEUDA.

## RESUMEN

La presente investigación se realizó en el estado de Durango en los municipios de Nuevo Ideal y Canatlan, con la colaboración de cazadores deportivos, pertenecientes al club de Tiro y Caza del Estado de Durango, durante la temporada de caza Invierno-Primavera 2004.

El objeto de esta investigación consistió en demostrar la presencia del Virus del Oeste del Nilo (VON), por medio de aislamiento viral, en aves migratorias acuáticas, en los municipios de los municipios de Canatlan y Nuevo Ideal. Para lo cual se recolectaron aves que fueron cazadas legalmente en la temporada invierno-primavera 2004, se recolectaron la cantidad de 66 aves de tres diferentes especies (Ganso nevado, Ganso Cara blanca y Ganso de Ross), de los cuales se extrajeron 48 encéfalos útiles para trabajarse en laboratorio, fueron enviados al laboratorio de alta seguridad de la CPA. Todas las muestras examinadas resultaron negativas a la presencia del VON por medio de aislamiento viral. Lo que nos indica la necesidad de realizar monitoreos más extensos en este tipo de poblaciones de aves, para la obtención de información epidemiológica del VON en nuevas ubicaciones geográficas que representen un riesgo para la salud pública y animal.

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
<b>Figura 1.-</b> Genoma del Virus del Oeste del Nilo, cadena EG101(Briton, 2002).	<b>7</b>
<b>Figura 2.-</b> El ciclo de replicación del VON.	<b>8</b>
<b>Figura 3</b> Ciclo de transmisión del VON(Hubálek y Halouzka, 1999).	<b>37</b>
<b>Figura 4</b> Ciclos de trasmisión del VON (Ciclo Urbano y Rural) (Montaño, 2002).	<b>38</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>CUADRO 1</b> Candidatos como hospederos reservorios y mosquitos vectores considerados importantes en el ciclo de transmisión del VON de acuerdo a la región (Komar, 2000).	<b>15</b>
<b>CUADRO 2</b> Número de muestras obtenidas en los 5 muestreos realizados	<b>71</b>
<b>CUADRO 3</b> Resultados obtenidos de los cinco muestreos realizados	<b>71</b>

- 1.17.1 Rutas Migratorias en América
- 1.17.1.1 Ruta del Sureste de los EEUU
- 1.17.1.2 Ruta Circular del Golfo
- 1.17.1.3 Ruta Trans-Golfo
- 1.17.1.4 Ruta Occidente de las Islas del Caribe y Atlántico Norte

**MARCO DE REFERENCIA** **64**

Estado de Durango

Municipio de Nuevo Ideal: Esfuerzos Unidos y Melchor Ocampo

Municipio de Canatlan: Ejido Medina y 5 de Febrero

**MATERIAL Y MÉTODOS** **67**

Tamaño de muestra y Número de repeticiones

Fase de Campo

Fase de Laboratorio

**RESULTADOS** **70**

**DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN** **73**

**LITERATURA CITADA** **74**

<b>1.12 Lesiones Patológicas</b>	<b>44</b>
1.12.1 Carga viral y Persistencia viral en órganos	
<b>1.13 Diagnóstico</b>	<b>46</b>
1.13.1 Serología	
1.13.1.1 Prueba de Reducción de Placas por Neutralización	
1.13.1.2 Ensayo inmunoenzimático	
1.13.1.2.1 ELISA indirecto en aves	
1.13.1.3 Prueba de Anticuerpos fluorescentes	
1.13.1.4 Inhibición de la Hemoaglutinación (HAI)	
1.13.2 Aislamiento e identificación viral	
1.13.2.1 Aislamiento viral	
1.13.2.2 Inmunohistoquímica (IHC).	
1.13.2.3 Transcripción inversa de la Reacción en cadena de la polimerasa	
1.13.3 Estudio Comparativo	
1.13.4 Diagnóstico Diferencial	
<b>1.14 Tratamiento</b>	<b>50</b>
<b>1.15 Medidas de Prevención y Control</b>	<b>51</b>
1.15.1 Educación Pública	
1.15.2 Control del Mosquito Vector	
1.15.2.1 Larvicidas	
1.15.2.2 Adulticidas	
1.15.3 Vacuna contra VON	
1.15.4 Programas de Vigilancia	
1.15.4.1 Vigilancia en Vertebrados	
1.15.4.2 Vigilancia en Humanos	
1.15.4.3 Vigilancia de Aves Muertas	
1.15.4.4 Vigilancia por Aves Centinelas	
1.15.4.5 Vigilancia Veterinaria	
1.15.5 Reducción de la Población de Vertebrados	
<b>1.16 Impacto Económico</b>	<b>60</b>
<b>1.17 Aves Migratorias y el desplazamiento del VON en América</b>	<b>60</b>

1.5.1.2 Aves Domésticas	
1.5.1.3. Mamíferos Silvestres	
1.5.1.4 Reptiles y Anfibios	
1.5.1.5 Mamíferos Domésticos	
1.5.1.6 Otros Mamíferos Domésticos	
<b>1.6 Vector Biológico</b>	<b>15</b>
<b>1.7. Antecedentes</b>	<b>17</b>
1.7.1 Europa	
1.7.2 África del Norte y Medio Oriente	
1.7.3 América	
<b>1.8 Ecología y Epidemiología del VON</b>	<b>22</b>
1.8.1 Europa	
1.8.2 Mediterráneo (Norte de África y Medio Oriente)	
1.8.3 África Central y Madagascar	
1.8.4 Sudáfrica	
1.8.4 Sur de Asia	
1.8.5 Norteamérica	
1.8.5 El Futuro	
<b>1.9 Ciclo de Transmisión de la eVON</b>	<b>36</b>
1.9.1 Formas de Transmisión sin Mosquito Vector	
1.9.1.1 Transmisión por trasplantes de órganos y transfusión sanguínea.	
1.9.1.2 Transmisión Oral	
<b>1.10 Patogénesis</b>	<b>40</b>
<b>1.11 Signología</b>	<b>40</b>
1.11.1 Caballos	
1.11.2 Humanos	
1.11.3 Aves	
1.11.4 La eVON en otros Mamíferos	

# Índice General

	Página
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<i>i</i>
<b>DEDICATORIAS</b>	<i>ii</i>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<i>iii</i>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	viii
<b>RESUMEN</b>	<i>ix</i>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	2
<b>OBJETIVOS</b>	3
<b>HIPÓTESIS</b>	3
Hipótesis Nula	
<b>MARCO TEÓRICO</b>	3
<b>1.1 Sinonimias</b>	3
<b>1.2 Definición</b>	4
<b>1.3 Distribución Geográfica</b>	4
<b>1.4 Etiología</b>	5
1.4.1 Clasificación del VON	
1.4.2 Morfología del VON	
1.4.3 Replicación del VON	
<b>1.5 Reservorios</b>	10
1.5.1 Hospederos Reservorios Vertebrados	
1.5.1.1 Aves Silvestres	

## INTRODUCCIÓN

La reciente aparición de Enfermedades Emergentes de los Animales (EEA), fuera de su distribución natural, representa una amenaza a la economía de los países y principalmente la salud pública de las poblaciones humanas y animales (USDA, 2000; Petersen y Roehring, 2001). El incremento del comercio legal e ilegal entre países, en condiciones menos restrictivas, trae consigo la presencia de EEA en nuevas locaciones y con ello originando grandes pérdidas económicas, afectando la producción de productos de origen animal, sin olvidar la aparición de enfermedades en las que se afecta la salud humana y animal, tales como Enfermedad del Virus del Oeste del Nilo (eVON) (Hubálek y Halouzka 1999; Wang, *et al*, 2001; Petersen y Marfin, 2002), Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), Influenza Aviar altamente patógena (IA), entre muchas otras. Esto trae consigo la necesidad de una mejor vigilancia especialmente en países que han logrado eliminar muchas enfermedades de los animales (USDA, 1999).

Dentro de los factores que modifican la distribución geográfica de las EEA están: rutas comerciales con poca o nula restricción, rutas migratorias de aves, tormentas, tráfico ilegal de animales. Uno de los factores importantes a considerar en la distribución geográfica de las enfermedades es el establecimiento de rutas migratorias por las cuales circulan año con año aves, llevando consigo diferentes EEA, transportándolos de un país a otro sin ningún tipo de restricción (Malkinson y Banet, 2002; Rappole y Hubálek, 2003)

El Virus del Oeste del Nilo (VON), es el agente etiológico de enfermedad denominada Fiebre del Oeste del Nilo. Pertenece a la familia flaviviridae, y es miembro del género *flavivirus* (Petersen y Roehring, 2001; Mc Lean *et al*, 2002) que necesita de un vector biológico invertebrado (mosquitos) para su ciclo de transmisión y de un hospedero vertebrado en este caso las aves, se han presentado hospederos incidentales como mamíferos, reptiles y anfibios (Komar, *et al*. 2003; Steele, *et al*. 2000). La confirmación de que las aves silvestres son las responsables de la aparición de brotes recientes en diversas partes del mundo (Lord y Calisher, 1970) como Europa, Medio Oriente, Asia y recientemente en Norte América, en el estado de New York (Komar, 2000), su rápida diseminación a

lo largo del país y la presencia de aves que migran de Norteamérica hacia Sudamérica, pone en alerta, ya que las aves son reservorios, y podrían diseminar la enfermedad a países vecinos como México (Lee, *et al.* 2002; Vargas y Cárdenas, 2002c). Es por esto que en el presente trabajo se realizará el monitoreo del VON en las poblaciones de aves migratorias en algunos municipios del Estado de Durango con la finalidad de obtener información epidemiológica que contribuya al estudio de esta enfermedad y al aporte de datos para los sistemas de vigilancia epidemiológica ya que del 2000 a la fecha se han registrado casos, tanto en mamíferos como en aves en nuestro país (Mateos, 2002).

## **JUSTIFICACIÓN**

Las aves silvestres establecen rutas migratorias (Lvov, *et al.* 2000; Tamayo, 2000) por las cuales viajan en determinado época del año, determinado por varios factores, estas rutas migratorias atraviesan por territorios nacionales de varios países incluyendo México, sin importar fronteras hechas por el hombre (Tamayo, 2000). Las aves silvestres y migratorias sirven de reservorios para el Virus del Oeste del Nilo así como muchas otras enfermedades ya sea de tipo endémico o exótico, algunas con mucha importancia por su alta patogenicidad, siendo una amenaza hacia la salud pública de humanos y animales (Tamayo, 2000; Rappole, *et al.* 2000; Sampson, 2001; Arroyo, *et al.* 2001).

La razón por la que se realizará este proyecto es por la necesidad de información epidemiológica acerca de estas aves migratorias que arriban a la Estado de Durango, y así establecer su papel de estas aves en la diseminación de esta enfermedad, de un lugar a otro sin importar fronteras o medidas sanitarias, ni de control establecidas por el humano.

## **OBJETIVOS**

Demostrar por medio de aislamiento viral la presencia del Virus del Oeste del Nilo (VON) en aves migratorias en la el Estado de Durango en los municipios de, Nuevo Ideal y Canatlan, ambos del estado de Durango.

Demostrar la importancia que tienen las aves migratorias como reservorios de enfermedades tales como Fiebre del Virus Del Oeste del Nilo (eVON).

## **HIPÓTESIS**

Al menos en una muestra procesada se encontrará positividad hacia el Virus del Oeste del Nilo.

## **HIPOTESIS NULA**

En ninguna muestra procesada se encontrara positividad hacia el virus del Oeste del Nilo.

## **MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Sinonimias**

La enfermedad del Oeste del Nilo (EON), también es conocida como Enfermedad del Nilo Occidental, Encefalitis del Oeste del Nilo, Fiebre del Nilo Occidental, Enfermedad del Virus del Oeste del Nilo (eVON) (Vargas, *et al.* 2002).

## 1.2 Definición

Es una enfermedad infecciosa, de tipo viral, transmitida por la picadura de mosquitos, que afecta principalmente a las aves y circunstancialmente, a equinos, humanos y otros mamíferos. En ambos casos, puede causar una encefalitis de gravedad variable. Este padecimiento de naturaleza emergente, no se encuentra listado en ninguno de los grupos de enfermedades y plagas exóticas y enzooticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. Sin embargo, en la clasificación internacional de enfermedades infecciosas del hombre, de la Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene la clave CIE-10-A92.3, mientras que en la clasificación de enfermedades de la Organización Internacional de Epizootias (OIE), tiene la clave 066.3 (Vargas *et al*, 2002).

## 1.3 Distribución Geográfica

La distribución geográfica del VON se ha registrado en aproximadamente 40 países de los cuatro continentes, África, Europa, Sur de Asia, Oceanía (sub-tipo Kunjin) (Komar, 2000) y más recientemente en Norteamérica (Komar, 2000; Brinton, 2002; Mc Lean, *et al.* 2002). El virus ha sido aislado a partir de humanos, aves, mamíferos, mosquitos, y garrapatas, en los países de esta distribución. Vigilancia serológica indica su distribución endémica en Egipto y el Medio Oriente, y probablemente en regiones tropicales de Centro y Oriente de África con brotes periódicos en regiones templadas al norte y sur, donde las aves migratorias probablemente introducen el virus anualmente. Posiblemente hay un patrón similar en la región sur de Asia en Pakistán y la India. El VON no había sido identificado previamente en el Hemisferio Occidental hasta la reciente introducción a la ciudad de New York en EEUU, en 1999. Como la distribución del virus se está expandiendo hacia otros sitios a partir de países como EEUU y Canadá, países de Sudamérica y Centroamérica están en riesgo por la probable introducción del virus a través de las aves migratorias de EEUU y Canadá en la primavera y verano. Una vez introducida, la actividad del VON podría establecerse en áreas tropicales en el

Hemisferio Occidente, así pues las aves migratorias podrían mover el virus entre Sudamérica y Norteamérica continuamente (Hubálek y Halouzka, 1999; Mc Lean, *et al.* 2002).

## 1.4 Etiología

El Virus del Oeste del Nilo es agente causal de eVON, es uno de los arbovirus (*transportados por artrópodos*) más ampliamente diseminados, desde África se han presentado brotes en el Medio Oriente, Europa, Oeste de Asia (Mc Lean, *et al.* 2002) y recientemente introducido a Norteamérica, marcando en 1999 por primera vez la introducción de este arbovirus del viejo mundo hacia el nuevo mundo (Petersen y Roehring, 2001), y en el 2003 se confirma la entrada del virus a México (CENAVE, 2003). La signología de la eVON se presenta principalmente en hospederos incidentales vertebrado como es el caso del humano, caballo y otros mamíferos (Mc Lean, *et al.* 2002). La manifestación más severa es la presentación de una encefalitis fatal en caballos y humanos, que causa cierta mortalidad en caballos y aves silvestres (Komar, 2000), es por esta razón la importancia de establecer vigilancia epidemiológica hacia esta enfermedad.

### 1.4.1 Clasificación del VON

La familia Flaviviridae consiste de tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*, compartiendo características en común. Los aproximadamente 70 virus actualmente clasificados en el género *Flavivirus* están divididos en doce subgrupos antigénicos (Brinton, 2002; Roehring, *et al.* 2003). El Virus del Oeste del Nilo (VON) pertenece al serocomplejo del Dengue (Li, *et al.* 2002) y virus de la Encefalitis Japonesa (Han, *et al.* 1999; Brinton, 2002; Davis, *et al.* 2001), el cual incluye también a Cacipacore, Koutango, Encefalitis del Valle de Murray, Encefalitis de St. Louis, Usutu, y virus de Yaounde, Straford, así como Kunjin (Hubálek y Halouzka, 1999; Bunning, *et al.* 2002; Saville, *et al.* 2003) endémico en Australia y Asia, por su secuencia homóloga a VON, recientemente conocido

dentro del subtipo (Briton, 2002; Anderson, *et al.* 1999). Todos los VON que han sido aislados se han agrupado en dos linajes genéticos, el Linaje 1 aquellos que han sido aislados solo de humanos (Petersen y Marfín, 2002; Brinton, 2002) como el causante del brote en Nueva York e Israel de 1999 al 2000 (Petersen y Marfín, 2002) y los aislados en Europa, Medio Oriente, África, India Australia, y recientemente New York (Komar, 2000), y el Linaje 2 restringido a brotes endémicos y enzooticos de África tropical (Brinton, 2002; Komar, 2000; Lanciotti, *et al.* 1999). Debido actividad antigénica cruzada entre diferentes flavivirus, las técnicas como hibridación *in situ* o análisis de Trascricpción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (TR-PCR) son necesarias para asegurar la identificación del VON como agente causal de un brote (Brinton, 2002). Estudios con estas pruebas tan específicas han descubierto que la cadena Israel 1998 (Isr98) es la misma que infecto a las aves en el Bronx Zoo (NY99)(Marr y Calisher, 2003).

#### **1.4.2 Morfología del VON**

Los viriones de VON son pequeños, tienen una capsida icosaedrica de aproximadamente 40-50nm, la capsida contiene una cadena simple de RNA con sentido positivo, con una densidad de aproximadamente  $1.2 \text{ g/m}^3$ , y un tamaño aproximado de 11000-12000 nucleótidos (nts). La nucleocapsida esférica es de aproximadamente 25nm de diámetro y está compuesta de múltiples copias de la proteína "C". Datos del microscopia crió electrónica sugieren que la envoltura y la capsida del virión tienen una simetría icosaedrica. Recientes estudios indican que la simetría es conferida sobre el virus por interacción entre proteínas E más que por interacciones entre proteínas de la capsida (Brinton, 2002). La capsida una vez envuelta en la célula hospedera, es modificada debido a la inserción de dos glicoproteínas en la membrana; la E [53kDa] y prM [18-20kDa], siendo estas, las dos más importantes (Petersen y Roehring, 2001; Brinton; 2002). El genoma del virión leído de 5'-3' está formado por 40 proteínas, en dos secciones una estructural que contiene tres fracciones en diferentes ubicaciones: C [97-465nts],

prM [466-741nts], M [742-966nts], y la E [967-2469nts], la segunda sección o parte No-estructural que la comprenden siete proteínas ubicadas en diferentes locaciones: NS1 [2470-3525nts], NS2A [3526-4218nts], NS2B [4219-4611nts], NS3 [4612-6468nts], NS4A [6469-6915nts], NS4B [6916-7780nts] y NS5 [7681-10395nts], tal como se muestra en la Figura 1 (Brinton; 2002; Petersen y Roehring, 2001). Las proteínas no estructurales del VON son multifuncionales. Las siete proteínas no estructurales, aparecen directamente o indirectamente involucradas en la síntesis del RNA. Sin embargo, son poco conocidas las interacciones entre las proteínas no estructurales y las proteínas celulares que podrían ser necesarias para la formación activa de los complejos virales (Brinton, 2002).

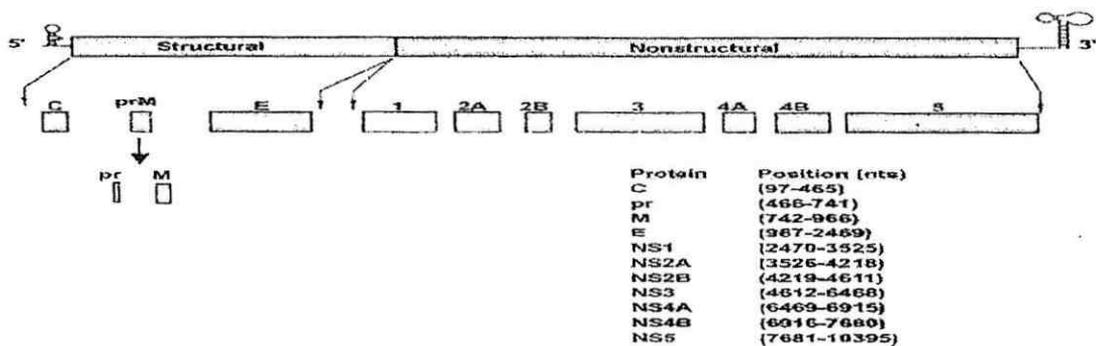


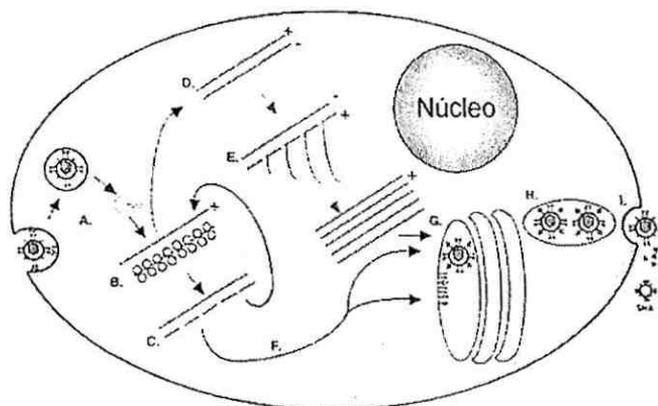
Figura 1.- Genoma del Virus del Oeste del Nilo, cadena EG101(Briton, 2002).

### 1.4.3 Replicación del VON

El VON ha sido cultivado en una amplia gama de células incluyendo células primarias de pollo, pato y células embrionarias de ratón, así como también en células continuas de humanos, cerdos, primates, roedores, anfibios, reptiles e insectos y por su puesto que no causa citopatología en todos los tipos celulares (Brinton, 2002; Saville, *et al.* 2003).

El virus se replica en el citoplasma en asociación muy estrecha con el retículo endoplásmico rugoso y finalmente salen como si fueran secretados por la célula. El virus toma su envoltura de las membranas celulares. En esta envoltura

se encuentran dos proteínas: E y M. Las proteínas E y M de la envoltura son muy importantes para definir las características del virus, como la especie de hospederos y tejidos que infecta, virulencia y la capacidad de estimular una respuesta inmune (Montaño, 2002).



**Figura 2.-** El ciclo de replicación del VON: a.-Entrada del virión. b.- Despliegue o traslación del virión RNA. c.- Proceso proteolítico de la poliproteína. d.- Síntesis de la hebra menor a partir del virión RNA. e.-Síntesis de el nuevo genoma a partir de la hebra menor de RNA. f.- Transporte de proteínas estructurales a la vesícula citoplásmica. g.- Encapsidación de el nuevo genoma. h.- Movimiento del nuevo virión hacia la superficie de la célula. i.-Liberación del nuevo virión. SHA (Slowly sedimenting hemagglutinin), la partícula subviral esta es continuamente liberada (Brinton, 2002).

Después del acoplamiento del virus a la célula receptora, los viriones entran a la célula mediante endocitosis debido a un pH bajo la membrana del virión se fusiona con la membrana de la vesícula endosomal liberando la nucleocapside dentro del citoplasma (Fig.2a). El genoma RNA es liberado y trasladada dentro de una poliproteína (Fig.2b). La proteasa viral serina, NS2B-NS3, y algunas proteasas celulares adhieren la poliproteína en muchos sitios para generar las proteínas virales maduras (Fig.2c). El RNA viral encargado de la polimerasa RNA (RdRp), NS5, junto con otras proteínas no estructurales y posiblemente proteínas celulares, copian cadenas negativas complementarias de la plantilla del genoma de RNA (Fig.2d), y estas cadenas negativas de RNA sirven como plantillas para la síntesis de nuevos genomas de RNA (Fig.2e). La síntesis de RNA de Flavivirus es

semiconservativa y asimétrica. La síntesis del genoma RNA positivo es 10 veces más eficiente que la síntesis de cadenas negativas de RNA. Estudios hechos con el virus de Kunjin sugieren que las nuevas cadenas de (-)RNA son copiadas a partir plantillas de cadenas de (+)RNA (forma replicativa), mientras las plantillas de cadenas negativas se multiplican eficientemente, las nacientes cadenas positivas son simultáneamente copiadas de una sola plantilla de cadena negativa (Replicativa Intermediada, RI). Una vez establecidas, ambas cadenas sintetizadas pueden continuar aun con la ausencia de síntesis de proteínas, indicando que la trascendente poliproteína precursora no es requerida. Es observada una amplia organización y proliferación del citoplasma, en la membrana endoplasmática reticular peri nuclear (ER) de células infectadas. Las plantillas RNA recién formadas pueden funcionar como plantillas para transcripción y traslación así como sustratos para la encapsidación. Estudios con Kunjin sugieren que la traslación es prerequisite para la replicación de nuevos RNA's y que la replicación es prerequisite para la encapsidación. Durante el inicio del ciclo de la replicación, los nuevos RNA's podrían alternar entre replicación y traslación, debido a que no hay a un suficientes proteínas estructurales acumuladas (Brinton, 2002; Li, *et al.* 2002).

El ensamblado del virión ocurre en asociación con membrana rugosa ER de la célula. Los viriones inmaduros intracelulares, los cuales contienen heterodimeros de E y prM (el precursor de M), acumulados en vesículas y son así transportados a través de una vía secretora del huésped donde los glicanos modifican a E y prM. Los viriones son transportados a la membrana en vesículas y son liberadas por exocitosis (Fig.2i). la progenie de viriones se comienzan a liberar de células de mamíferos a las 10 a 12hrs después de la infección, y los títulos de virus extracelulares no son observados hasta aproximadamente 24hrs. Las células infectadas producen partículas subvirales no infecciosas pero antigénicas llamadas hemaglutininas de sedimentación lenta (SHA), las cuales son compuestas de células de membrana insertadas con proteínas E y M así como algunas prM (Fig.2) (Brinton, 2002; Li, *et al.* 2002).

## 1.5 Reservorios

### 1.5.1 Hospederos Reservorios Vertebrados

Muchos experimentos se han llevado a cabo para determinar la susceptibilidad de diferentes especies hospederas potenciales para el VON, la patogénesis del virus en las especies hospedadoras, el desarrollo de viremia en determinados hospedadores y su capacidad de infectarse por especies vectores, y si los animales podrían actuar como reservorios para el virus o servir como especies centinelas efectivas. Los resultados de las infecciones experimentales puede ser afectada por factores relacionados con el hospedero y virus incluyendo; la especie, la edad del hospedero, alguna infección previa con VON u otro similar, inmunocompetencia del virus, la cadena del virus usada, la dosis, el numero de pasajes y la ruta de infección (Mc Lean, *et al.* 2002).

#### 1.5.1.1 Aves Silvestres

Las aves silvestres son los huéspedes primarios para el VON en su rango, geográfico endémico. El virus se ha aislado y se han detectado anticuerpos a partir de un gran numero de especies de aves silvestres. Hasta hace poco, la infección de aves silvestres por VON producía principalmente una respuesta subclínica e inaparente, variando los títulos de circulación dependiendo de la especie aviar y de la cadena del virus usada. Al emerger una nueva cadena mucho mas virulenta del VON en Israel (1998) y en los EEUU(1999) se produjo un nuevo patrón de la enfermedad en aves silvestres (Malkinson y Banet, 2002; Mc Lean, *et al.* 2002).

En estudios con la cadena de Egipto 101 del VON se observo, que los Cuervos Hooded (*C. corone sardonius*) desarrollaron altos títulos de circulación del virus y todos murieron, el virus fue aislado a partir de encéfalo y bazo de las aves. En el caso de los House Sparrow (*Passer domesticus*) desarrollaron relativamente altos títulos durante algunos días, solo algunos sobrevivieron, y el virus fue aislado de cerebro o bazo de los cadáveres; sin embargo aquellos

muertos se les atribuye que fue asociado a el cautiverio y captura. En Buff-Backed herons (*Bubulcus ibis*), kestrels (*Falco tinnunculus*), y Palm doves (*Streptopelia senegalensis*), se confirmo una excelente transmisión por medio del mosquito vector (Mc Lean, et al. 2002). Estudios experimentales comprobaron la transmisión por inoculación intramuscular en Sudáfrica Cape sparrow (*P melanurus*) y Red bishop (*Ecleptes orix*) (Mc Lean, et al. 2002). Los experimentos indican que casi todas las especies inoculadas fueron susceptibles a el VON, a pesar de no ser iguales. (Malkinson y Banet, 2002; Mc Lean, et al. 2002).

Diferentes especies de aves silvestres se han usado para aprender más acerca de la dinámica de transmisión y biología del VON, aquí enlistaremos aquellas aves que se han reportado hasta la fecha, que han sido utilizadas en estudios experimentales incluyendo también de aquellas especies en las que se han hecho hallazgos del virus o de la enfermedad por medio de una infección natural dentro del ciclo natural de transmisión del VON: Hooded crows (*C. corone sardonios*), House sparrows (*Passer domesticus*), Buff-backed herons (*Falco tinnunculus*), Palm doves (*Streptopelia senegalensis*), Cape sparrow (*P. Melanurus*), Red Bishop (*Euplectes orix*), Pigeons (*Columba livia*), Northern pintail (*Anas acuta*), European pochard (*Aythya ferina*), rooks (*C. frugileus*), gulls (*Larus crassirostris*), Coopers Hawk (*Acapiter cooperii*), Red tailed hawk (*Buteus jamaicensis*), (*Tringa ochropus*)(*Larus ridibundus*)(*Vanella vanellus*)(*Streptopelia turtur*), Mallard (*A platyrhynchos*), Swallows and Martins (Hirudinidae), Sparrows (*P montanus*), Nestling (*Ardeola ralloides*), White storks (*Ciconia ciconi*), Parrot (*Corocopsis vasa*), Egrets (Ardeidae), bird (*Sylvieta rufescens*), Thrush (*Turdus olivaceus*), Red eyed bulbul (*Pycnonotus nigricans*), Red billed quelea (*Quelea quelea*), Musked weaver (*Ploceus velatus*), Tawny eagle (*Aguila rapax*), Egret (*Egretta garzetta*), Cormorant (*Phalacrocorax sp*), Flamings Chilens (*Phoenicopterus chilensis*), Flycatcher (*Sayornis phoebe*), cuervos y blue jays (Malkinson y Banet, 2002).

### 5.5.1.2 Aves Domésticas

En este tipo de aves hay una amplia variedad de especies. Su respuesta virémica es generalmente baja lo cual los hacen parecer mas bien un hospedero incidental o secundario, en ambos ciclos de transmisión ya sea urbano o rural. Estas características los hacen ser las especies ideales para programas de vigilancia por medio de centinelización. Los resultados experimentales de infecciones en aves domesticas son utilizadas en la evaluación de su rol en el ciclo de transmisión y el potencial que tienen como centinelas (Mc Lean, *et al.* 2002).

Todas las especies de aves domesticas son susceptibles a la infección de VON, pero solo polluelos (*Gallus domesticus*) y ganso domestico (*Anser anser domesticus*) mostraron signos de la enfermedad y mortalidad. Pollos de menos de 3 semanas de edad y gansos jóvenes pueden amplificar la enfermedad infectando a mosquitos, pero pollos viejos y pavos (*Meleagris gallipavo*) son refractarios a la infección o producen viremias muy bajas, por tal razón sirven como centinelas en los programas de vigilancia (Malkinson y Banet, 2002; Mc Lean, *et al.* 2002).

Para hacer validas las conclusiones a cerca de su participación en el ciclo de transmisión natural, es necesario realizar mas estudios experimentales y epidemiológicos (Mc Lean, *et al.* 2002).

### 1.5.1.4 Reptiles y Anfibios

Infecciones experimentales en Ranas de lago (*Rana ridibunda*) con una cadena Rusa de VON produjo una viremia suficiente para infectar a la especie de mosquito *Cx pipiens*. En reptiles se han registrado viremias de larga duración para otros tipos de mosquitos transportadores. Y se ha garantizado por investigaciones el potencial como huéspedes reservorios de los reptiles y anfibios (Mc Lean, *et al.* 2002).

### 1.5.1.5 Mamíferos Domésticos

Los animales domésticos frecuentemente están expuestos al VON, pero la enfermedad clínica por VON es rara y solo en algunos casos la infección causa encéfalomiелitis en caballos. Registros indican que han muerto caballos por causa de la infección en Marruecos, Italia, Francia, y Norteamérica. La presencia de una cadena nueva y mas virulenta del VON esta alterando los patrones clínicos de la enfermedad en animales domésticos (Mc Lean, *et al.* 2002).

Se han observado viremias bajas en infecciones experimentales por VON en caballos, cual sugiere que los caballos no son probablemente una fuente importante del virus para infectar mosquitos (Mc Lean, *et al.* 2002).

### 1.5.1.6 Otros Mamíferos Domésticos

Se han realizado algunos estudios experimentales con otras especies de animales domésticos (ovejas, cabras, búfalos de agua, corderos, vacas (*Bos indicus*), ganado vacuno, mulas, camellos, asnos, corderos, cerdos, hámsteres, ratas ratones, monos y perros) para determinar su susceptibilidad al VON y su papel potencial en el ciclo de transmisión (Wang, *et al.* 2001; Mc Lean, *et al.* 2002).

Los animales domésticos aparte de los caballos no parecen ser susceptibles a la infección VON pues la presencia de títulos altos es muy raro en especies que no sean aves y muy rara vez produce títulos de viremia capaces de producir la muerte a los hospedadores para el virus. Muchas especies desarrollan adecuadamente anticuerpos pudiendo ser utilizados para evaluar la exposición local a el VON así como centinelas para programas de vigilancia (Mc Lean, *et al.* 2002; Komar, 2000).

En lemures se han observado prolongadas viremias con VON y prevalencia de anticuerpos, que desaparecen en un periodo de 6 meses, en Madagascar. Experimentalmente ha sido observado que el virus es capaz de persistir en monos en un largo periodo, desarrollando posteriormente encefalitis y una infección

asintomático. Estudios experimentales y epidemiológicos sugieren que diferentes especies de primates podrían jugar un importante papel como huéspedes amplificadores para VON en áreas endémicas (Mc Lean, *et al.* 2002).

Se inocularon por vía subcutánea a nueve Macacos Rhesus (*Macaca rhesus*), presentando una infección asintomática. La infección intracerebral resulto en encefalitis en 34 de 56 y 7 casos fatales, mientras 22 de los 56 no mostraron signos solo fiebre de corta duración. El desarrollo de signos clínicos variaba con el tipo de cadena del virus inoculada. La persistencia del VON variaba con la cadena inoculada, persistió hasta 22 semanas en monos sintomáticos que sobrevivieron a la infección y en monos asintomáticos. Se recupero el virus por co-cultivos de tripsina y se observo que después de 2 meses de persistencia el virus había perdido su patogenisidad para los ratones blancos, y después de 22 semanas el virus se recupero principalmente de cerebelo, ganglios subcorticales, linfonodos, y riñones, observándose que el virus había perdido su neurovirulencia y propiedades citopatólogicas (Mc Lean, *et al.* 2002).

Tres Macacos Bonnet (*M. radiata*) fueron inoculados por vía intranasal, observándose en dos de ellos signos clínicos y títulos bajos de viremia a los 5 y 6 días pos infección (p.i.), los signos indicaban una encefalitis viral a los 8 días p.i, y muerte el día 10 p.i. El virus fue aislado de tejido del SNC en la necropsia y los tres presentaban cambios histopatológicos que sugerían una encefalitis viral. Infecciones experimentales con VON produce ocasionalmente muerte en monos Rhesus y Cercopitecos (Mc Lean, *et al.* 2002).

La infección experimental de lémures (*Lemur fulvus*) con VON (con las cadenas Egypt 101 y MgAn 798, originalmente aisladas a partir de un loro en Madagascar en 1978) desarrollaron viremias en los días 4-6 subsecuentes a la infección por mosquitos *Aedes aegypti*. Los Lemurs no desarrollaron signos clínicos. La cadena de Madagascar produjo viremias de mas larga duración que la de Egipto, y los resultados indican que los Lemurs podrían jugar un papel en la ecología local del VON en Madagascar (Mc Lean, *et al.* 2002).

En aquellos mamíferos en los cuales se han hecho hallazgos y aislaciones del virus, no implica en muchas especies que sean reservorios eficientes para el

VON ni mucho menos que se desarrolle la eVON, como ha sucedido en algunos casos y bajo ciertas situaciones, ya que los mamíferos son hospederos accidentales, a continuación se enlistan aquellas especies en las que se han desarrollado estudios para el VON, así como aquella masto fauna peri doméstica y silvestre que se han hecho hallazgos relevantes para el estudio del virus: Rhesus machaques (*Macaca rhesus*), Bonnet macaques (*M. radiata*), Lemurs (*Lemur fulvus*), Wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), Oso pardo (*Ursus arctos*), Roe deer, Red deer, Fallow deer, Mouflón, Wild boar, Brown hare, bats (*Pteropus rufus*), (*Mus musculus*), Ratas (*Rattus spp*), Black drongo (*Dicrurus adsimilis*), Kukrichane thrushes (*Turdus libonyacus*), grass mice (*Arvicanthus niloticus*), Rata (*Rattus rattus*), House shrews (*Suncus murinus*), Murcielagos (*Rousettus leschenaulti*, *Eptesicus fuscus*, *Myotis lucifugus*) (Mc Lean, et al. 2002).

## 1.6 Vector Biológico

El virus del Oeste del Nilo dentro de su ciclo de transmisión natural, necesita para su diseminación de un vector invertebrado (ocupándolo como transporte) y una especie hospedero reservorio vertebrado (para su replicación), los cuales varían según la ubicación geográfica (Cuadro 1) (Komar, 2000).

**Cuadro 1.-** Candidatos como hospederos reservorios y mosquitos vectores considerados importantes en el ciclo de transmisión del VON de acuerdo a la región (Komar, 2000).

Región	Hospederos Vertebrados	Mosquitos Vectores
Europa	House sparrow ( <i>Passer domesticus</i> )	<i>Culex pipiens</i> <i>Cx. modestus</i> <i>Coquillettidia richardii</i>
África	House sparrow Hooded crow ( <i>Corvus corone sardonius</i> ) Otras aves	<i>Cx. univittatus</i> <i>Cx. poicilipes</i>  <i>Cx. antennatus</i> <i>Cx. decens</i> <i>Aedes albocephalus</i>

		Mimomyia species
Medio Oriente	Turtle dove ( <i>Streptopelia turtur</i> ) Otras aves	Cx. univittatus
Surasia	Aves	Cx. vishnui Cx. quinquefasciatus Cq. Richardii
Oceania	Herons ( <i>Ardeidae</i> ) Otras aves	Cx. annulirostris
Norteamérica	Aves Passeriformes	Cx. pipiens

El VON ha sido aislado a partir de algunas especies de mosquitos pertenecientes a los géneros : *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Minomyia*, *Monsonia* y *Coquillettidia* en África, Asia, Medio Oriente, Europa, y Norteamérica (Brinton, 2002; Komar, 2000). Siendo el genero vector *Culex* el mas importante y mas ampliamente estudiado lo largo de la historia del VON. La característica mas importante de los vectores es ser ornitofílicos, ya que es indispensable para la supervivencia del VON establecerse en un vertebrado para su multiplicación, las aves son hospederos competentes que sirven como reservorios para el VON, ocasionalmente estas especies al alimentarse de otros hospederos los convierten en hospederos incidentales o accidentales tal es el caso de los humanos, caballos y otros mamíferos (Marr, Calisher, 2003; Mc Lean, et al. 2002; Brinton, 2002).

Las condiciones ambientales como fuertes lluvias o continuas inundaciones, irrigación y temperaturas altas pueden causar un incremento en las poblaciones de mosquitos y también en la incidencia de virus que ocupen como vectores mosquitos, tal es el caso del VON. Sin embargo los lugares con escasas lluvias, con limpiezas periódicas fuera de las alcantarillas, el VON puede encontrar otro tipo de vector artrópodo no culicoide, siendo este un hospedero incidental o de segunda importancia y no esencial para la perpetuación del virus. Se han observado infecciones naturales en múltiples ocasiones y se han evaluado experimentalmente y ha sido vectores competentes para el VON en especies como: *Ornithodoros maritimus*, *O. erraticus* y *Argas hermani*, *A. arboreus*, *A. persicus* (garrapatas suaves) y *Hyalomma marginatum* (garrapatas duras),

además se ha aislado el VON a partir de otras cinco especies de garrapatas duras en África, Europa y Asia (Abbassy, *et al.* 1993; Komar, 2000; Brinton, 2002; Mc Lean, *et al.* 2002; Li, *et al.* 2002), el virus se aisló de una garrapata *Haemaphysalis leachii* tomada de un perro, en Sudáfrica (Mc Lean, *et al.* 2002). En Austria *Oeciacus hirundinis* ha sido implicada como vector biológico para el VON (Komar, 2000).

En no menos de 16 especies de mosquitos son vectores competentes en los que se han realizado estudios experimentales acerca de la transmisión del VON y potencial como vectores locales, se han usado especies tales como: *Aedes vexans*, *Ae Aegypti*, *Ae Albopictus*, *Ae japonicus*, *Ae sollicitans*, *Ae taeniorhynchus*, *Ae caspius*, *Culex pipens*, *Cx nigripalpus*, *Cx quiquefasciatus*, *Cx salinarius*, *Cx univittatus*, *Cx trateniorhynchus*, *Cx theileri*, *Ochlerotatus japonicus*, *Oc sollicitans*, *Oc taeniorhynchus*, *Oc triseriatus* y otras más especies (Vargas y Cárdenas, 2002c; Bunning, *et al.* 2002; Brinton, 2002; Marr y Calisher, 2003).

## 1.7. ANTECEDENTES

El virus del Oeste del Nilo(VON), causante de la Enfermedad del Virus Oeste del Nilo (eVON), fue aislado por primera vez en 1937, de la sangre de una mujer adulta (Komar, 2000; Wang, *et al.* 2001) con fiebre, quien participaba en un estudio sobre paludismo en el distrito de West Nile, en el norte de la República de Uganda (Petersen y Roehring, 2001; Asnis, *et al.* 2000; Montaña, 2002; Dohm, *et al.* 2002). Desde su primer aislamiento se han presentado brotes humanos esporádicos como en Israel [1951-1954 y 1957], Sudáfrica [1974], Rumania y Marruecos [1996], Túnez [1997], Rusia [1999] (Petersen y Marfín, 2002; Brinton, 2002), Francia e Israel [2000], en Europa desde los 60's han ocurrido brotes y casos humanos periódicos (Mc Lean, *et al.* 2002), no fue sino hasta de los 90's cuando se observaron brotes en el nuevo mundo (Petersen y Roehring, 2001; Montaña, 2002), Estados Unidos [2000] y Canadá [2002] (Montaña, 2002), posiblemente como respuesta a los casos reportados en EEUU en 1999 (Vargas y Cárdenas, 2002a).

## 1.7.1 Europa

En Europa el VON ha sido encontrado en aves silvestres y mamíferos en diversos países (Mc Lean, *et al.* 2002). Además ha sido encontrado periódicamente como agente causal de breves epizootias en Francia, Rumania, Rusia, Algeria, Madagascar, Senegal, y Sudáfrica y algunos brotes de la enfermedad infrecuentemente en humanos (Brinton, 2002).

En 1971 a 1973, en el este de Eslovaquia, el VON fue aislado en 11 especies de aves silvestres, en el sur de Monrovia, Checoslovaquia en 1984-1987 se detectaron anticuerpos contra VON a partir de aves migratorias como cisnes y martines. Durante 1995-1997, se detectaron 273 pericos de casa, en la Republica Checa (Mc Lean, *et al.* 2002).

En Francia el primer brote de VON reportado, causando signos nerviosos en caballos fue en 1962, después se reportaron tres casos más en 1996, no se presento ningún caso hasta el año 2000, en que se reportaron 131 caballos con signos nerviosos, confirmándose 76 en laboratorio como VON (Mc Lean, *et al.* 2002).

En Bucarest, Rumania después del brote de VON en 1996-97 (Hubálek, Halouzka, 1999), por medio de neutralización de anticuerpos se detectaron aves positivas silvestres y domésticas (Tardei, *et al.* 2000; Mc Lean, *et al.* 2002), se presentaron 500 casos clínicos y un caso fatal, siendo la epidemia más grande de una enfermedad por un arbovirus en Europa (Hubálek y Halouzka, 1999).

El primer reporte en Italia ocurrió en caballos Tuscany en 1998 (Hubálek, Halouzka, 1999), fueron confirmados 14 caballos infectados con VON, 8 de ellos lograron recuperarse (Mc Lean, *et al.* 2002).

En los meses de julio a septiembre de 1999, ocurrió un brote de meningoencefalitis asociado con VON, en el sur de Rusia con aproximadamente 1000 casos y 40 muertos. El área endémica del VON incluye Maldivia, Ucrania, Bielorrusia, el área sur de la Rusia Europea, y el oriente de territorio de Siberia, Altai, Armenia, Azerbaijón, Kazahistatan, Tayikistán, Uzbekistán, y Turquía.

Durante los últimos 20 años, se ha registrado la enfermedad en Kazajstán y en la República de Asia Central, región de Astracán (en Rusia), Ucrania y Azerbaijón. Se ha observado un alto riesgo de exposición al VON en el desierto de la cuenca del Volga, donde ocurrió el brote desde el mes de julio a septiembre de 1999 (Lvov, *et al.* 2000).

### **1.7.2 África del Norte y Medio Oriente**

El VON es endémico en algunas partes de África, el Medio Oriente y el Oeste de Asia, principalmente la India. Su distribución geográfica se extiende a través de África, Medio Oriente, y Oriente templado y tropical de Eurasia. Se estima que durante los 50's, el 40% de la población humana en el Delta del Nilo en Egipto era seropositiva al virus. La epidemia más grande ocurrió en Cape, provincia de Sudáfrica, en 1974, cuando aproximadamente se registraron 3000 casos clínicos del virus (Rappole, *et al.* 2000; Brinton, 2002).

Hasta principios de los 90's el virus fue confinado a África, Europa y Asia. En 1941 ocurrió un brote en Tel Aviv, sin muertos registrados (Marr y Calisher, 2003). En los próximos 60 años a este brote ocurrieron 7 brotes en Israel y sus cercanías (Marr y Calisher, 2003). La infección de VON en vertebrados puede haber estado ocurriendo en el Medio Oriente durante siglos. Ahora el virus se ha extendido a nuevas áreas del mundo y a nuevas poblaciones causando infecciones caracterizadas por nuevos signos y síntomas (Marr y Calisher, 2003).

En la epidemia del 2000 en Israel, ocurrió encefalitis en cerca del 59% de 417 casos humanos. De 233 pacientes hospitalizados (tasa de casos fatales 14%), más de 98% tenían fiebre, 46% cambios cognitivos, y 17% dolor abdominal y mialgia. Cerca del 18% presentaron cansancio. Fue observada parálisis flácida, como en Estados Unidos en 1999 (Marr y Calisher, 2003).

### **1.7.3 América**

En agosto de 1999, la Dra. Déborah Asnis, una clínica en enfermedades infecciosas en Queens, New York, reportó dos casos de encefalitis asociada con debilidad muscular a el Departamento de Salud del los Estados Unidos. Dr. Marci Layton y colegas en el Departamento de Salud montaron una investigación integral en la que finalmente identificaron al Virus del Oeste del Nilo como la causa del reciente brote de enfermedad de humanos y cuervos (Bernard, *et al.* 2001; Petersen y Mafín, 2002).

Entre finales de agosto y principios de diciembre de 1999, Ludwing *et al.*, en un estudio de 437 cadáveres de aves recolectados en el *Bronx Zoo and Wildlife Conservation*, reconocieron por primera vez la actividad del virus en aves silvestres y en cautiverio en los Estados Unidos (Wang, *et al.* 2001; Marr y Calisher, 2003). En Nueva York ocurrió una encefalitis humana (Lanciotti, *et al.* 1999) y en caballos (Komar, 2000) causada por un arbovirus, al principio se pensó que se trataba de la Encefalitis de San Luis [SLE] (Shieh, *et al.* 2000), siendo el epicentro la isla de Staten (Bernard, *et al.* 2001; Vargas y Cárdenas, 2002a) y el primer caso en el Hemisferio Occidental (Wang, *et al.* 2001; Bunning, *et al.* 2002). Los primeros casos de humanos con eVON en New York, aparecieron en un periodo de nueve semanas; de julio a septiembre del 2000 (Vargas, *et al.* 2002). En el año de 1999 se detectaron 62 personas, incluyendo 7 muertos de alrededor de 60 años de edad (Lee, *et al.* 2002; Davis, *et al.* 2001), todos en puntos geográficos diferentes de tal manera que en 1999 se encontraron casos en 1 estado solamente, en el 2000 se encontraron en 3 estados y en el 2001 se encontró que 10 estados tenían casos positivos a eVON (Petersen y Marfín, 2002).

Hasta diciembre del 2001, se habían identificado, cuando menos, 53 personas positivas a la eVON en EEUU. Durante el año del 2002, han ocurrido 673 casos humanos positivos y 32 muertes (Vargas y Cárdenas, 2002b), en la primavera del 2001 el virus ya se había diseminado a 29 estados de EEUU (Petersen y Marfín, 2002).

A pesar de la sospecha de que el VON había entrado a Ontario, por causa de los casos positivos ocurridos en zonas vecinas como New York, no fue

documentado si no hasta el 2000 (Lee, *et al.* 2002). Desde su llegada a Norteamérica en 1999 el VON se ha extendido rápidamente a través de los Estados Unidos y dentro de Canadá. La primera detección en mosquitos y aves en Ontario fue en el 2001, a finales del 2002 la actividad viral había sido documentada en Nueva Escocia, Québec, Ontario, Manitoba y Saskatchewan. En septiembre del 2002 se presentó un brote de VON (Pepperell, *et al.* 2003), donde fueron reportados casos de humanos infectados en Québec y el sur de Ontario (Nosal, Pellizari, 2003). El brote de VON del 2002 fue el mas grande que se ha presentado en Norteamérica, así como el brote por arbovirus más grande en el hemisferio occidental (Pepperell, *et al.* 2003). Los diez muertos fueron atribuidos directamente a VON o las complicaciones hospitalarias tales como la edad, inmunitaria, y agudeza de la enfermedad (Pepperell, *et al.* 2003).

En Ontario han ocurrido 17 de los 18 muertos en Canadá por VON, 307 de 325 casos se han confirmado (Sibbald, 2003).

Durante el verano del 2002, la Secretaria de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentos (SAGARPA) recibió reportes de una enfermedad con encefalitis en diferentes áreas de México, posteriormente se reportó brotes de eVON en caballos a lo largo de la frontera de Texas en los estados de Coahuila, Tamaulipas y Chihuahua. Otros casos sospechosos fueron reportados en estados del sur. Se registro también el primer aislamiento de VON en México en un Cuervo común (*Corvus corax*) en el estado de Tabasco, uno de los dos cuervos importados de Estados Unidos en 1999 (Lvov, *et al.* 2000; Estrada, *et al.* 2003).

La Secretaría de Salud en México dio a conocer la muerte de un hombre de 72 años de edad, con diagnóstico confirmado de eVON, murió el 20 de agosto del 2002, después de haber estado tres semanas en el área de Houston, Texas, EEUU, por lo que este caso se considera importado (Vargas y Cárdenas, 2002b).

El virus es endémico en partes de África, Europa, el Medio Oriente y Asia, y brotes en los Estados Unidos en los últimos 3 años lo que indica su establecimiento en el hemisferio occidental (Diamond, *et al.* 2003).

## 1.8 Ecología y Epidemiología del VON

La ecología y epidemiología del VON es muy variada de región en región y de continente a continente. La epidemiología es un reflejo de las condiciones ecológicas y ambientales, y de la disponibilidad y abundancia de los hospederos vertebrados y la presencia del vector. La circulación de cadenas de VON a lo largo de un ecosistema con los factores biológicos de los hospederos y vectores, así como su yuxtaposición en espacio y tiempo, afectan la dinámica de transmisión. La presencia de hospederos vertebrados silvestres es necesaria para mantener, amplificar y diseminar naturalmente el VON en el ecosistema. La efectividad de una especie vertebrada para servir como un adecuado hospedero dependerá de una número de factores. Las relaciones hospedero-virus y hospedero-vector, preferencias del vector y capacidad de especies de vectores para transmitir el virus combinada con el comportamiento y características poblacionales de las especies vertebradas, determinan las especies hospederas primarias para el virus. Por tanto el ciclo de transmisión viral tiene patrones regionales de preferencia hacia especies de hospederos y vectores (Corwin, *et al.* 1993, Mc Lean, 2002). Una nueva infección viral frecuentemente resulta de cambios en los tipos de hospederos, distribución geográfica, o ecología de patógenos conocidos previamente (Tyler, 2001).

Los programas de vigilancia para la presencia de VON en países de Asia, Europa, Medio Oriente y África han detectado anticuerpos, y mas raramente virus, en una amplia variedad de aves y mamíferos. Los rangos de seroprevalencia varían grandemente entre cada programa de vigilancia de diferentes regiones y entre los sueros recolectados en diferente tiempo en la misma área. El papel y la relativa importancia de muchas especies como reservorios para VON es aún no conocida. En zonas templadas como Sudáfrica y Europa y en el Medio Oriente, datos indican que las aves migratorias podrían ser importantes en la diseminación del VON. La interpretación de estos datos es complicada, puesto que existe reacción cruzada entre arbovirus en muchos de los pruebas serológicas que se han usado (Mc Lean, *et al.* 2002).

## 1.8.1 Europa

Los primeros brotes de Encefalitis por Virus del Oeste del Nilo en caballos ocurrieron en 1962 en Francia y 1963 en Egipto. 30 años después, brotes en caballos ocurrieron en Maruecos [1996], Italia [1998], Israel [2000] y en Francia en [2000]. En Francia, se registró un 10% de Morbilidad y un 30% de Mortalidad en el brote de 1962, similar al reportado en el brote del 2000 con 34% de mortalidad en el mismo país. En Egipto, el reporte de seroprevalencia de anticuerpos a Virus del Oeste del Nilo en caballos asintomáticos fue de 14% a 89% dependiendo de la ubicación. En Maruecos, el porcentaje de los casos fatales fue 44.7% [42/94], y en Italia, fue de 42% [6/14] (Mc Lean, *et al.* 2002).

La incidencia del VON en Europa no está completamente conocida. En los 60's, fueron observados casos en el sur de Francia, sur de Rusia, España, Suroeste de Rumania, en los 70's, 80's, y 90's en Belarus, oeste de Ucrania, sureste de Rumania y Chechenia. La eVON en Europa ocurre durante el periodo del año, cuando hay una máxima actividad de los mosquitos vectores, que es entre los meses de julio a septiembre (Hubálek y Halouzka, 1999). En Europa, la presencia del VON fue identificado en 1958, cuando dos Albaneses tenían anticuerpos específicos contra VON. El primer aislamiento Europeo del virus fue registrado en 1963 a partir de pacientes y mosquitos en el Delta del Rhone y a partir de pacientes y garrapatas *Hyalomma marginatum* en el Delta del Volga. Subsecuentemente el VON fue aislado en Portugal, Eslovaquia, Moldavia, Ucrania, Hungría, Rumania, Chechenia e Italia (Hubálek y Halouzka, 1999).

Han sido detectados anticuerpos y virus en animales silvestres y mamíferos en numerosos países de Europa. Han sido detectados anticuerpos en una variedad de especies mamíferas; conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculis*), Oso pardo de vida libre oso pardo (*Ursus arctos*), wild Boards y hedgehogs. Por medio de Inhibición de la Hemoaglutinación fueron detectados anticuerpos contra VON en 16.7% de Roe deer, Red deer, Follow deer, Wild board, Brown hare en Marovia, Checoslovaquia. En pequeños mamíferos fueron encontrados con anticuerpos contra VON en varios sitios en Austria. Al este de Eslovaquia se

encontró circulación del virus en granja de 608 ovejas y en un biotipo con alta frecuencia de aves migratorias, fueron detectados anticuerpos contra VON en el 4.9% de ovejas, 4.1% ganado bovino y 12% de cabras (Mc Lean, *et al.* 2002).

Durante 1971-1973 en Eslovaquia el VON se aisló a partir de cuatro especies de aves silvestres (*Tringa ochropus*, *Larus ribibundus*, *Vanellus vanellus*, *Streptopelia turtur*). Un programa de vigilancia serológica en Anseriformes en Checoslovaquia detecto anticuerpos NT para VON en un Mallard (*A platyrhynchos*), pero no en el suero de otros 38 patos y 106 gansos. Un 5.5% de prevalencia de anticuerpos HI fueron detectados en 273 gorriones domésticos capturados en una área sub-urbana al noreste de la Republica Checa durante 1955-1997. Anticuerpos HI contra VON fueron detectados en 1.5% de 183 golondrinas y martines (*Hirundinidae*) migratorios capturados en Marovia, Checoslovaquia en 1984-1987, de los cuales no se pudo aislar el virus de los sueros muestras. Un programa de vigilancia de 296 aves de 19 especies de 5 familias de Paseriformes capturadas en Checoslovaquia en la migración de otoño se les encontraron anticuerpos HI contra VON al 9.7%. En Polonia en 1995-1996, se detectaron anticuerpos HI en 9 de 358 gorriones domésticos y 6 de 66 gorriones tree (*P montanus*). Las diferencias en seroprevalencias entre las dos poblaciones sedentarias, se debió a sus diferentes hábitos entre las dos especies (Mc Lean, *et al.* 2002).

Muestras de aves silvestres y domesticas fueron colectadas en lugares en Bucarest, Rumania, en respuesta a una epidemia de infección de VON en humanos en 1996. NT anticuerpos fueron detectados en 1 de los 12 paseriformes examinados. Alrededor del 41% de 73 aves domesticas fueron positivas. Estas incluyen 5 de 13 patos, 1 ganso, 19 de 52 pollos, 1 pavo real hembra y 4 de 6 pavos. El VON fue aislado a partir de una cría de ave de *Ardeola ralloides* en Junio de 1977 de Kyzyl-Agach reservación de Azerbaidzhan (Mc Lean, *et al.* 2002).

El primer registro de brote de VON en caballos en Italia ocurrió en Tuscany en 1998. Un total de 14 caballos fueron confirmados infectados con VON por serologia y todos presentaban ataxia y debilidad de los miembros delanteros; 8 de

los caballos afectados se recuperaron completamente. Dos de los caballos murieron y a cuatro se les practico la eutanasia (Mc Lean, *et al.* 2002).

### 1.8.2 Mediterráneo (Norte de África y Medio Oriente)

En el área del Mediterráneo ocurre regularmente una transmisión endémica del VON, lo que provoca una alta incidencia de la inmunidad a el virus en humanos en el área del Delta en Egipto. El aislamiento del virus a partir de aves silvestres en Egipto e Israel incluyen a aves en el ciclo de vida del virus. El VON fue aislado de un palomo salvaje enfermo en el área Central-Norte del Delta del Nilo en Julio de 1953. el virus ha sido aislado repetidas veces a partir de sangre de niños con fiebre y a partir de *mosquitos Culex spp* en el área endémica del Delta del Nilo. Anticuerpos contra VON fueron detectados por ELISA en 8.5% de 1324 sueros de aves colectados en 1990 en el Delta del Nilo, región de Egipto. La mas alta prevalencia (21%) fue encontrada en Rock Doves, y 14% en Wagtails y gorriones domésticos. A partir de 261 roedores peri domésticos capturados el 11.5% fueron positivos a anticuerpos (26% *Mus musculus* y 15% *Rattus spp*) (Mc Lean, *et al.* 2002).

Durante una vigilancia que se llevo a cabo entre enero y mayo de 1954, 436 muestras fueron colectadas a caballos, asnos y mulas en el Alto y Bajo Egipto. La prevalencia de anticuerpos en animales de 6 años o mas fue de 14% para Alejandría a 89% en Kenya. El rango de neutralización de anticuerpos encontrado fue 67% en caballos, 47% en asnos y 44% en mulas. En Marruecos un total de 94 equinos (caballos, asnos y mulas) fueron reportados de ser afectados por VON de agosto a 30 de noviembre de 1996 (Ultimo caso declarado el 12 de octubre), con infección fatal en 42 animales. No hubo alguna prevalencia ni en raza ni en edades, aunque los animales mas jóvenes fueron posiblemente menos afectados que los adultos (Mc Lean, *et al.* 2002).

De acuerdo con la vigilancia serológica hecha por Taylor *et al.* en 1956, en el Delta del Nilo en la región de Egipto, el punto de infección comprendía un amplio rango de vertebrados. De 882 muestras de sangre de mamíferos comunes

y aves colectadas del área endémica del VON de Egipto, 40% de los mamíferos y 40% de las aves tenían NT anticuerpos a VON, 86% de los caballos, 78% camellos, 72% water búfalo y 63% de Hooded crows exhibieron las mas altas prevalencias de anticuerpos a el VON. El VON fue aislado de 2 de 44 palomos domésticos y de 1 de 159 Hooded crows examinados. El virus fue aislado de el cerebro, bazo y sangre de uno de los palomos enfermos (Mc Lean, *et al.* 2002).

Un programa de vigilancia para la infección de VON en vertebrados en Israel en 1959-1960, reveló que el 14% de 473 aves silvestres, 1.5% de aves domesticas, 37% de ganado vacuno, 11% de 275 roedores, y 7% de 43 murciélagos eran positivos a HI anticuerpos. Se encontró mas alta prevalencia en las aves silvestres residentes y residentes de invierno que en las de residentes de verano. Un programa de vigilancia en Israel de 2061 aves de las de 100 especies, tomadas de cuatro localidades, detectaron VON en la sangre de tres turtles doves (*Streptopelia turtur*). Estas aves fueron colectadas en septiembre de 1964 y agosto de 1965, en el área de Rubin de la costa sur de Tel Aviv. Los resultados indicaron que estaba ocurriendo una infección local, como las aves, son visitas de verano fueron muestreadas a final de verano. De septiembre a octubre de 1998, el VON se aisló de fledgling white storks (*Ciconia ciconi*) recientemente llegada de Eilat de Europa y NT anticuerpos fueron detectados en aves que habían arribado unos días antes. Estos resultados indicaban que las aves habían sido expuestas al virus en Europa antes de su migración al sur; la presencia de NT anticuerpos en suero de storks en Alemania fortaleció esta opinión. Los hallazgos sugieren que la epizootia de 1999 en Israel del VON en gansos domésticos, fue originada en Europa. Un brote de VON ocurrió en gansos domésticos jóvenes en Israel en noviembre de 1999 con 400 casos y 160 muertos. Los gansos restantes en los humedales fueron destruidos (Mc Lean, *et al.* 2002).

### **1.8.3 África Central y Madagascar**

En África la fauna simia ha sido sugerida como el reservorio natural de un cierto numero de arbovirus, y muchos estudios indican que interviene en el ciclo de vida de diferentes arbovirus. Anticuerpos a VON han sido detectados en

chimpancés y una pequeña proporción de lemurs. En análisis serológicos en Lemurs de Madagascar se encontró que 1.9% de 377 individuos pertenecientes a 5 especies fueron positivos a HI anticuerpos de VON. Se observaron, en Lemurs silvestres y experimentales en Madagascar, prolongadas viremias con VON y prevalencia de anticuerpos que desaparecen en un periodo de 6 meses. Experimentalmente, se ha demostrado que el VON es capaz de persistir durante largos periodos en monos. Estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que diferentes especies de primates y lemurs podrían jugar un importante rol como hospederos amplificadores para VON en áreas endémicas. De 94 chimpancés capturados en Aut Uele, territorio de Ango, 37% tenían NT anticuerpos a VON (Mc Lean, *et al.* 2002).

Una cadena de VON fue aislada de una urraca (*Coracopsis vasa*) en Morondava área de Madagascar en 1978 y 19% de 209 lemurs examinados tenían HI anticuerpos a flavivirus. Seis cadenas de VON fueron aisladas de los órganos de urracas (*Coracopsis vasa*) durante 1978-1981, y cinco fueron obtenidos de la sangre de Airones (Ardeidae) en 1981 en Madagascar. Análisis serológicos en animales de la isla se encontró que 11.4% de 96 murciélagos (*Pteropus rufus*) y 33% de 40 Bueyes analizados de Mandoto, y 2% de 99 bueyes de Tsiroanimanddy fueron positivos para HI anticuerpos a VON. Fueron encontrados anticuerpos en alta proporción en murciélagos frugívoros (*Pteropus rufus*) indígenas de Madagascar (Mc Lean, *et al.* 2002).

Se aislaron dos VON de 130 muestras de camello en Kano en el Sudan zona de la Savannah al Norte de Nigeria; el aislamiento fue hecho en la temporada de lluvia durante una vigilancia realizada en 1966-1970. No se aisló ningún VON de 374 muestras de ganado tomadas en la zona Guinea Woodland. Además fue aislado de un Black Drongo (*Dicrurus adsimilis*), dos Kukrichane thrushes (*Turdus libonyacus*) y dos grass mice (*Arvicanthus niloticus*) en Nigeria en 1966-1972. Las dos cadenas de virus aisladas (IbAn 4029) fue aislada a partir de un grass mice capturado en el Sudan Woodlands del Norte de Nigeria en 1970. Una vigilancia detecto anticuerpos a VON en 62% de camellos, 4% de ganado vacuno y 0% en cabras en Nigeria. Un programa de vigilancia de humanos y

animales domésticos en Nigeria encontró que 3 de 49 vacas, 10 de 51 ovejas, 9 de 50 cabras, y 13 de 50 camellos en Ibadan y Maiduguri fueron positivas a anticuerpos contra VON; 123 de 304 humanos en Ibadan fueron seropositivos en el mismo estudio (Mc Lean, *et al.* 2002).

Work et al asignados por la Fundación Rockefeller Foundation para estudiar arbovirus en Egipto, aislaron 23 cadenas de VON a partir de muestras de sangre de niños febriles en el área de Sindbis y encontraron que este virus causaba más la enfermedad en niños y adultos jóvenes que en adultos mayores y además aislaron VON a partir de Hooded Crow (*Corvus corone sardonius*) para la demostración de una infección experimental de que las aves con una viremia alta de  $10^9$ UFC, tienen una tasa de mortalidad del 100% (Marr y Calisher, 2003).

#### 1.8.4 Sudáfrica

Durante un estudio ecológico de Sindbis y VON en África del sur, 2022 aves de (17 familias , 51 especies) fueron examinadas para HI anticuerpos con VON; 12% aves de 27 especies fueron positivas. Algunos paseriformes como Hirundinidae, Sylviidae, Motacillidae y Plodeidae mostraron particularmente altos HI anticuerpos contra VON. El VON fue aislado de un ave (*Sylvietta rufescens*) en Sudáfrica. Además estudios sobre la ecología del VON en el Sur de África en 25 años de 1965-1980 aislaron 158 veces el VON de 139 mosquitos (*Cx univittatus* ), 14 a partir de sangre humana, 2 de hámster centinelas, 1 a partir de una paloma centinela y 1 a partir de un perro. La mayoría de los virus aislados fueron en el altiplano, y solo algunos en la costa. Las infecciones en aves y los dos casos clínicos en humanos concuerdan con esto. En el altiplano árido de Karo fue mas alto el rango de aislamiento viral que en el de Highveld, lo cual es posiblemente relacionado a las altas temperaturas en verano aumentando la capacidad del vector. El virus fue aislado a partir de una infección natural de un ave canora y de una paloma centinela. La población aviar fue encontrada de tener anticuerpos a el virus como el caso de 20% de 405 aves de caza domesticas y 13% de 2022 aves silvestres, mientras en Karo, poco después de un brote en humanos, el 53% de

322 aves presentaban anticuerpos a VON. Estudios con palomas centinelas indicaron que la infección es un evento de verano anual. Siguiendo una epidemia de VON en humanos, se capturaron 322 aves silvestres y se analizaron por HI y NT anticuerpos; 53% fueron positivas (92% de 24 *olive thrush*, *Turdus olivaceus*; 86% de 72 Laughing dove, *Streptopelia senegalensis*; 50% de 48 gorriones domésticos; 40% de 153 Bishop, *Eucleptes orix*; 2 de 9 red-eyed bulbul, *Pycnonotus nigricans*; 3 de 5 red billed quelea, *Quelea quelea*; 3 de 9 masked weaver, *Ploceus velatus*; y 2 de 2 Turtles dove, *Streptopelia capicola*) (Mc Lean, et al. 2002).

Fueron usado palomos para vigilar la transmisión del virus en dos áreas en Sudáfrica, en Moist Highveld y en Bethulie. En Highveld, las infecciones ocurrían de enero a mayo y en diciembre; en Bethulie, las infecciones ocurren en enero a junio. Las infecciones fueron registradas cada años entre 1969-1971 en Bethulie, y anualmente excepto 1969 del estudio de Highveld de 1967-1971, la incidencia mensual fue baja en ambas regiones. Esto sugiere que existe una infección enzootica en las dos áreas. *Culex univittatus* fue recolectado de las cajas del los palomos (Mc Lean, et al. 2002).

En un programa de vigilancia que se usaron perros en la región de Orange Free en África central, 46%(174) de 377 perros analizados presentaron HI anticuerpos (1:20 o mas) contra VON y 14.4% de los estos presentaban títulos de hasta 1:640. De los 174 sueros con HI anticuerpos el 93% fueron analizados por NT y el 85% de ellos fueron positivos con títulos de 1:8 o mas. El VON se aisló de un perro que fue positivo a HI anticuerpos y de una garrapata (*Haemaphysalis leachi*) tomada de un perro. Los datos producidos en esta vigilancia combinada con resultados de infecciones experimentales indican que los perros juegan un papel minúsculo en la mantenimiento del VON, pero no son probablemente un hospedero reservorio importante en la epidemiología del virus en Sudáfrica (Mc Lean, et al. 2002).

#### 1.8.4 Sur de Asia

Se han realizado algunas investigaciones en animales silvestres y en ganado en la India y Pakistan, pero la interacción ecológica y la reacción cruzada en algunas pruebas de laboratorio complican la interpretación. Una tawny eagle (*Aquila rapax*) y una pequeña Egret (*Egretta garzeta*) de 89 aves de 28 especies analizadas en el Distrito de Bankura en el Oeste de Bengal, India, fueron positivos a HI y NT anticuerpos a VON, mientras que ningún de 127 pequeños mamíferos de seis especies fueron positivos a VON. Durante una vigilancia serológica en animales domésticos en el área de Bareilly, Uttar Pradesh, India, fueron detectados anticuerpos HI en 24% de caninos, 27% de porcinos, 25.9% de caballos, 13.8% de water búfalo, 6.8% de cabras, 1.2% en ganado y 0% de Ovejas (Mc Lean, et al. 2002).

De 85 [26.8%] de 317 de 32 diferentes especies capturadas en el parque nacional de Changa Manga de la provincia de Punjab, Pakistan, tenían anticuerpos NT a VON en 1978, las muestras positivas fueron de 21 de 32 especies de aves analizadas. De 58 vacas hindúes (*Bos indicus*) analizadas, 36% tenían anticuerpos NT, el restante de los analizados, una de 13 ratas (*Rattus rattus*), uno de dos House shrews (*Suncus murinus*), y ningún de los 13 murciélagos fueron positivos a anticuerpos NT. La primer aislamiento del VON (VCR No. 68856) a partir de un murciélago frugívoro (*Rousettus leschenaulti*) capturado en Horabail, India en 1968 (Mc Lean, et al. 2002).

#### 1.8.5 Norteamérica

Aunque no es conocido como y cuando el VON fue introducido a Norte América, posibles mecanismos incluyen: gente que viaja a New York, transporte del virus por mosquitos, garrapatas o la importación de aves infectadas. Muchos factores son asociados a la diseminación geográfica y emergencia y distribución de agentes patógenos zoonóticos, incluyendo demografía y cambios sociales, modernos métodos de transportación, cambio de las condiciones climáticas,

migración de animales y aves y alteración de artrópodos reservorios y vectores (Shieh, et al. 2000).

En la ciudad de New York, EEUU, en septiembre de 1999, fue aislado el VON por primera vez en Norteamérica en un brote que afectó aves, exóticas y caballos así como también humanos. Murieron aves silvestres, particularmente Cuervos americanos, esto ocurrió antes de que se viera el primer caso en humanos y fue muy lo suficientemente notorio, así como en varias aves de la colección zoológica de New York. La necropsia de un cormorán (*Phalacrocorax* sp.), dos Flamingos Chilenos (*Phoenicopterus chilensis*) y un Faisán hindú revelaron meningoencefalitis y severa miocarditis. Un cuervo muerto tenía evidencia patológica de encefalitis. Los virus aislados de estas aves por PCR y por secuencia de DNA fueron relacionadas con VON y la secuencia genómica fue idéntica en los casos de encefalitis en humanos y los encontrados en aves (Mc Lean, et al. 2002).

Un total de 430 aves vivas fueron muestreadas en septiembre de 1999 en NYC siguiendo la epidemia de VON y 33% de NT anticuerpos a VON. La mayoría aves residentes peri domésticos o domésticos y gansos, pollos, gorriones, y palomas domésticas tuvieron una prevalencia alta a VON. Una cadena de VON fue aislada a partir de un flycatcher (*Sayornis phoebe*) (Mc Lean, et al. 2002).

En octubre 5 de 1999, fueron identificados aves positivas a VON en todo el distrito de la ciudad de New York (NYC) y en múltiples condados alrededor de la NYC en New York, New Jersey, y Connecticut. Los virus aislados fueron obtenidos a partir de mosquitos *Culex* spp colectados a mediados de septiembre en áreas localizadas en NYC. Además alrededor de los condados de NYC en Long Island, New York (Nassau y Suffolk) y en New Jersey y Connecticut de forma en que la epizootia se expandió en aves (Mc Lean, et al. 2002).

El VON fue aislado a partir de 28 de 31 cuervos americanos muertos colectados en el condado de Fairfield y New Haven, Connecticut entre el 13 de septiembre y 12 de octubre de 1999. A la necropsia los cuervos tenían abundantes lesiones de subdural y/o hemorragias celómicas; alrededor de uno-tres individuos presentaban emaciación y heces en pluma constantemente fue observada

constantemente. En la examinación Histopatológica, las lesiones de las aves indicaron una encefalitis viral multifocal. El VON fue aislado a partir de un Cooper Hawk encontrado vivo el 25 de septiembre de 1999, se observó que tenía dificultad para incorporarse y caminaba en círculos y tenía convulsiones; el ave murió 11 días después y fue encontrada a la necropsia extensas hemorragias en el cerebro. El VON fue aislado de 2 especies de mosquitos (*Culex pipiens* y *Aedes vexans*) colectados en septiembre de 1999 de la misma área de Connecticut (Mc Lean, *et al.* 2002).

Además de la epidemia humana de VON en el verano y otoño de 1999 en la NYC, ocurrió una epizootia en la población aviar, resultando aves muertas en New York, New Jersey y Connecticut. De agosto a diciembre de 1999, 256 de 671 aves muertas fueron confirmadas por el laboratorio estar infectadas por VON. El Departamento de Salud del estado de New York reportó en 1999 un total de 5697 aves muertas de 17339 y el estado de Connecticut se reportaron 1040 cuervos muertos (Mc Lean, *et al.* 2002).

Siguiendo la epizootia en aves y la epidemia en las poblaciones de humanos de NYC en 1999, un brote de VON en caballos en Long Island, incluía 20 casos con dos muertes y 7 caballos destrozados. En 1999 en New Jersey fue aislado el VON del cerebro de un gato doméstico que fue eutanasiado una vez desarrollado la signología neurológica, sin niveles de anticuerpos presentes. Un programa de vigilancia con 12 gatos sanos de NYC en 1999 no detectó anticuerpos a VON; en la misma vigilancia 2 de 73 caballos saludables y 10 de 189 perros saludables fueron positivos a anticuerpos NT del VON (Mc Lean, *et al.* 2002).

La vigilancia del VON en área de NYC durante el invierno de 1999-2000, detectó RNA viral de VON en tres pools de mosquitos *Cx pipiens* colectados en febrero y un pool proporcionó un aislamiento del VON vivo. Estos hallazgos indican que el VON puede persistir hasta la primavera y emerger con mosquitos adultos a iniciar el ciclo de transmisión en el área. Además el VON fue aislado del cerebro de un Halcón cola roja, que murió en febrero del 2000 en el condado de

Westchester, New York, EEUU, meses después de que la actividad del vector había cesado en el área (Mc Lean, *et al.* 2002).

En el 2000, la actividad del VON se había expandido a la frontera norte de Canadá y al sur Carolina Norte, con reportes de aves positivas de 136 condados, en 12 estados y en el Distrito de Columbia en el oriente de los Estados Unidos. Esta distribución de la actividad epizootica en aves silvestres fue una expansión a 27 condados y distritos de tres estados alrededor de la NYC. En el 2000, se reportaron la mas alta seropositividad en aves el estado de New York (1236), New Jersey (1280) y Connecticut (1118). Esfuerzos de vigilancia en 312 condados in 16 estados reportaron al Departamento de Salud 104816 aves muertas (30601 cuervos y 74215 de otras especies). De esas aves reportadas se tomaron 12961 para analizarlas y 4305 fueron positivos al VON. Los cuervos fueron los mas frecuentemente analizados y 3824 de 7580 analizados fueron positivos, mientras solo 481 de 5381 aves de otras especies analizadas fueron positivas a VON. Los Cuervos cubrieron el 88.8% (3824) de las 4305 aves reportadas positivas. El VON fue encontrado en el estado de New York en el 2000, con el epicentro en la NYC y los condados aledaños. El porcentaje mayor de aves positivas a VON fue mas alta en el epicentro que afuera de el. La presencia del VON en aves muertas no indica un diagnostico definitivo de el VON como la causa de la muerte. Muchas de ellas no mostraron lesiones patológicas aparentes. Además, el rango de prevalencia de infección, ya que solo fueron muestreados aves muertas. En el 2000, el virus fue aislado de dos especies de murciélagos insectívoros (big brown bat, *Eptesicus fuscus*, y un little brown, *Myotis lucifugus*) de New York (Mc Lean, *et al.* 2002).

Siguiendo la epidemia y epizootia de VON en el estado de New York, EEUU, el Departamento de Salud desarrollo un sistema de reporte para aves muertas vistas por el publico, además de un completo trabajo de vigilancia en el estado en el 2000 (Mc Lean, *et al.* 2002).

Un total de 71,332 aves muertas fueron reportadas de 62 condados en el estado de New York; 24.6% (17571) de las aves reportadas fueron cuervos americanos. De las aves muertas muestreadas 1263 fueron positivas a VON de 61 condados (Mc Lean, *et al.* 2002).

El laboratorio confirmó 60 casos en aves de 235 colectada y analizadas en Staten Island, New York durante el 2000; un total de 4910 habían sido reportadas en esta área. Los reportes de muertes en aves iban en incremento al final de la semana del 7 de julio y el pico de muertes ocurrió en la semana del 21 de julio (Mc Lean, *et al.* 2002).

En los EEUU fueron confirmados 60 casos de encefalitis por VON en el 2000 ( Basado al criterio dado por los servicios veterinarios de la USDA APHIS). De estos casos el 38% fueron casos fatales o requerían eutanasia. En Connecticut en el 2000, siete caballos con signos neurológicos tenían evidencias de infección aguda por VON. Los datos de desafío variaban del 29 de agosto a el 10 de octubre (Mc Lean, *et al.* 2002).

En el 2001, fueron confirmados 738 casos de equinos, con signos de Encefalitis por Virus del Oeste del Nilo en 19 estados de EEUU, con un 25% de mortalidad. Muchos más casos en 2002 ocurrieron en EEUU. La enfermedad se ha diseminado a 40 estados, y habían sido reportado 14,717 casos de equinos el 3 de enero del 2003. la información de la mortalidad no esta disponible (Seville, *et al.* 2003).

La vigilancia del VON se realizo de nueva cuenta en el invierno del 2000-2001 en Noreste de los EEUU y primero apareció en 5 diferentes estado en mayo del 2001. para agosto del 2001, la vigilancia de la mortalidad de los EEUU detecto que la distribución de la actividad del VON se extendió dramáticamente e incluía a Florida y Georgia en el sureste de los EEUU. La epizootia del VON en aves se desarrollo en Florida rápidamente en una epizootia en caballos y casos humanos. Como en el 2000, los cuervos cubrían el 89% de las aves seropositivas (Mc Lean, *et al.* 2002).

Se determinó por medio de estudios genéticos que la cadena mexicana de VON fue introducido de Estados Unidos a diferencia que cadenas encontradas en la península de Yucatán por medio de aves migratorias (Estrada, *et al.* 2003)

En 2001 se inician actividades de vigilancia epidemiológica. En agosto de 2002 Coahuila notifica un caso de humano importado de Texas. A finales de 2002 se confirman 21 equinos, 1 en Tamaulipas, 17 Coahuila y 3 en Yucatán. En 2003

se han confirmado 21 equinos y 3 aves en Nuevo León, 2 aves en Yucatán y 2 aves en Tamaulipas (Estrada, et al. 2003; CENAVE, 2004).

En México los casos confirmados en animales afectan a 12 municipios de 5 estados. Entre 2002 y hasta abril del 2003 se han estudiado: 125 casos humanos probables, todas negativas a VON, 1707 equinos, siendo 44 positivos, 9344 aves, confirmando 7 de ellas (Estrada, et al. 2003; CENAVE, 2004).

### 1.8.5 El Futuro

El Virus del Oeste del Nilo puede causar casos esporádicos en humanos, hatos o brotes de eVON, en Europa. Los factores ambientales, incluyendo actividades humanas que aumentan las densidades de población de los vectores (irrigación, fuertes lluvias seguidas por inundaciones, aumento de temperaturas de las usuales, y la formación de nichos ecológicos favorecen a las poblaciones de mosquitos) permite la reaparición de esta enfermedad. Por lo tanto, los climas húmedos pueden producir un incremento en la distribución y abundancia del mosquito vector. La vigilancia de la eVON (monitoreo de la densidad de población y tasas de infección de los vectores principales, reexaminación de sueros en vertebrados y grupos humanos expuestos, y rutina de diagnóstico de infecciones humanas) deben ser dirigidas a áreas afectadas (Hubálek, 1999).

El mecanismo de persistencia del VON en los focos endémicos de Europa presentan cambios, para investigaciones adicionales. La hipótesis general de como un arbovirus podrá persistir bajo condiciones de climas adversos ya ha sido postulada. El virus puede persistir en Hembras *Culex* spp (*Cx univittatus*) en hibernación; infección transovárica de la progenie de *Culex* spp; o infecciones cronológicas a hospederos vertebrados, que podrían ser aves o ranas. Alternativamente, el virus puede ser reintroducido por aves migratorias infectadas a partir de focos tropicales o subtropicales a intervalos irregulares. En otro sentido, si el esquema de reintroducción es correcto, un incremento en la actividad de VON en África puede ser seguida por una ocurrencia epidémica de eVON en Europa en los próximos años (Hubálek y Halouzka, 1999).

El virus se ha diseminado a todo lo largo y ancho de Estados Unidos, Canadá, Islas Caimán, representando esto numerosos retos para clínicos, microbiólogos, veterinarios, personal de programas de control de mosquito, y oficiales en salud pública (Petersen, *et al.* 2002). Los caballos infectados con cadenas de VON-NY99 desarrollaron bajos niveles de viremia de corta duración (Bunning, *et al.* 2002).

El personal dedicado a la investigación epidemiológica puede usar signos no comunes, para sospechar de posible infección por VON incluyendo muerte de aves y síndromes neurológicos en humanos (Estrada, *et al.* 2003).

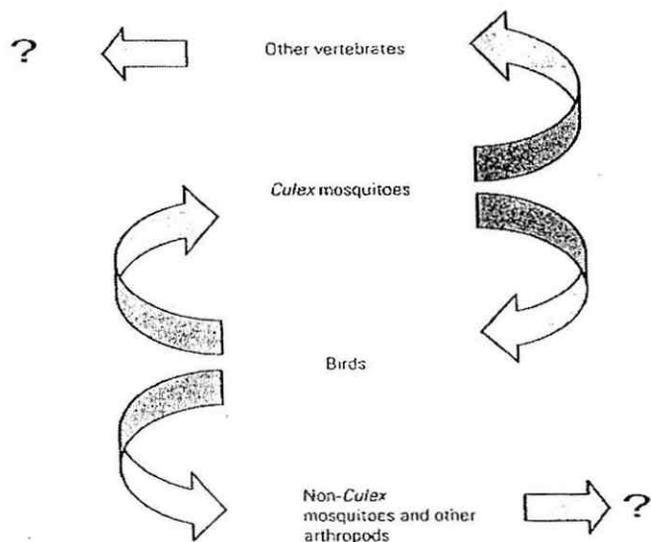
El impacto de VON sobre la salud humana en regiones (como México) donde los habitantes han experimentado anteriormente un contacto con otros flavivirus, como el dengue, Encefalitis de San Luis, Ilheusm, Bussuquara, Jutiapa y Fiebre Amarilla, puede ser diferente a regiones (como EEUU y Canadá) donde la exposición a flavivirus es muy limitado. La infección de VON en personas con inmunidad previa a flavivirus puede presentar atenuar la enfermedad, por la protección cruzada de los anticuerpos (Estrada, *et al.* 2003).

## **1.9 CICLO de TRANSMISIÓN de la eVON**

El VON es diseminado durante el periodo adulto del mosquito principalmente en ecosistemas acuáticos, cuando el mosquito se alimenta de sangre por constante transmisión entre mosquitos y aves, que actúan como reservorios naturales (Komar, 2000; Hubálek y Halouzka, 1999). Los mosquitos infectados pueden transportar en sus glándulas salivales partículas virales e infectar a aves susceptibles mientras se alimentan sobre ellas. Una vez infectada el ave, desarrolla una viremia infectante dentro de 1-4 días subsecuentes a la exposición (Komar, 2000) siendo  $10^5$ UFP/ml el nivel mínimo de viremia requerido en una ave para infectar a un mosquito (Brinton, 2002) (ver Figura 4). Aquellos mosquitos que se alimentaron de un hospedero infectado y si logran sobrevivir al extrínseco periodo de incubación (aproximadamente dos semanas dependiendo de la temperatura, y especie de mosquito) estarán listos para alimentarse otra vez

de un hospedero reservorio susceptible. Los humanos, caballos y otros mamíferos raramente desarrollan niveles altos de viremia que sean capaces de infectar a un mosquito. Las aves son los reservorios más importantes de esta enfermedad, siendo de gran importancia en su diseminación y preservación, aún cuando se deben presentar ciertas condiciones para asegurar la sobre vivencia de el virus (Brinton, 2002; Komar, 2000), la capacidad del virus de transmitirse a su progenie por vía tras ovárica aumenta la posibilidad de su preservación en el medio ambiente (Baqar, *et al.* 1993; Dohm, *et al.* 2002). El ciclo de Transmisión puede amplificarse cuando el complejo ecológico y las condiciones climáticas se encuentran, una vez dadas las condiciones se da la trasmisión (Komar, 2000).

**Figura 3** Ciclo de transmisión del VON(Hubálek y Halouzka, 1999).

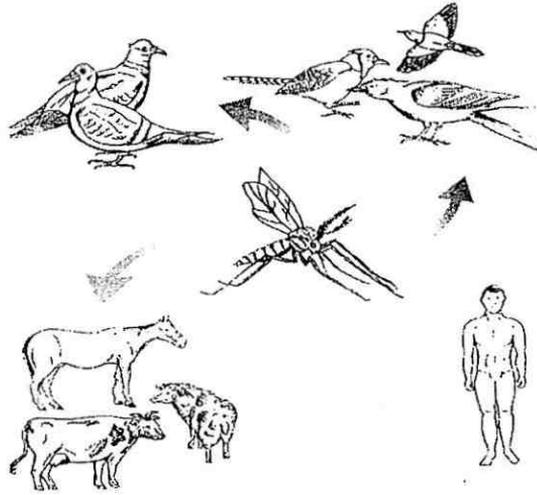


Las especies vectores y hospederos reservorios vertebrados varían con la ubicación geográfica. En general las especies de mosquitos *Culex* (Marr y Calisher, 2003; Komar, 2000) sirven como vectores y los passeriformes son hospederos reservorios en los ciclos enzooticos de transmisión del VON. Debido a infecciones naturales en múltiples ocasiones en garrapatas suaves y duras, se han propuesto como un posible vector transportador alternativo en los ciclos de

transmisión del VON (Komar, 2000) en hábitats secos o fríos, donde no haya mosquitos (Hubálek, Halouzka, 1999). En Austria los Swallow bugs (*Oeciacus hirundinis*) han sido implicados como vectores (Komar, 2000). Aun el ciclo rana-mosquito puede funcionar bajo ciertas circunstancias (Hubálek y Halouzka, 1999).

En Europa, la circulación de VON es confinado a dos tipos básicos de ciclos y ecosistemas: ciclo rural (silvestre; usualmente aves acuáticas y mosquitos ornitofílicos ) y ciclo urbano (aves domésticas y mosquitos alimentados por aves y humanos, principalmente *Cx pipiens/ molestus*). El principal ciclo es el rural, pero el ciclo urbano predominó en Bucarest durante el brote de 1996-97. La circulación de eVON en Europa es similar a la Encefalitis de San Luis en Norteamérica , donde se observo el ciclo rural de aves exoantropicos-*Cx tarsalis* alternando con el ciclo urbano de aves synantropicas-*Cx pipiens/ quiquefasciatus* (Hubálek y Halouzka, 1999; Bernard, et al. 2001).

**Figura 4** Ciclos de trasmisión del VON (Ciclo Urbano y Rural) (Montaño, 2002).



La capacidad del virus para transmitirse de manera vertical, en diferentes especies de mosquitos, aumenta la probabilidad de su presencia al año siguiente de su aparición, debido a que se inicia su diseminación con el inicio de un nuevo ciclo del mosquito vector, por tanto la transmisión transovárica es un factor más a

tomar en cuenta en los programas de control y vigilancia en contra del VON (Rosen, 1988; Baqar, *et al.* 1993; Dohm, *et al.* 2002).

## **1.9.1 Formas de Transmisión Sin Mosquito Vector**

### **1.9. 1.1 Transmisión por trasplantes de órganos y transfusión sanguínea**

Además de la transmisión por mosquitos, ha sido ligada la transmisión por medio de trasplantes de cuatro órganos de un solo donador. Investigaciones están tras la clave de conocer el riesgo de transmisión por transfusión sanguínea o productos sanguíneos a la fecha ya se ha comprobado la transmisión por: Lactancia, Vía trasplacentaria, Accidental e inoculación con agujas de Laboratorio, Trasplantes y se estudia la posibilidad que por medio de transfusiones sanguíneas pueda también transmitirse el virus (Petersen, *et al.* 2002; Bunning, *et al.* 2002).

### **1.9.1.2 Transmisión Oral**

Se evaluó la susceptibilidad oral al VON en 15 especies de aves, representantes de 11 familias y 7 ordenes. Se confirmó la susceptibilidad a adquirir la infección del VON oralmente en Búho Cornado, cuervo americano, Common grackle, Finch, y gorrión doméstico. El búho desarrollo viremia después de ingerir un ratón infectado, el Cuervo americano mostró infección después de consumir un cadáver de gorrión domestico infectado por VON (con un 83% de susceptibilidad n=6). Los Cuervos americanos y los Gorriones domésticos fueron infectados después de ingerir un solución acuosa que contenía  $10^{7.4}$  PFU (con un 100% de susceptibilidad). Los Grackles se infectaron después de la ingesta de una solución acuosa que contenía 1 000 PFU (con un 1 00% de susceptibilidad). Uno de los dos Finches domésticos desarrollaron viremia al comer mosquitos infectados, representando una dosis de  $10^7$ PFU, en estudios anteriores de Langeving *et al* no fue posible infectar oralmente a los pollos (Komar, *et al.* 2003).

## 1.10 Patogénesis

La puerta de entrada del virus es por medio de la picadura de un mosquito vector del VON, después de la picadura del mosquito, el virus se disemina a través del torrente sanguíneo, la viremia algunos caballos infectados es muy baja y en algunos no se desarrolla. Una vez infectados los caballos es improbable que sirvan como importantes hospederos amplificadores naturales. Los humanos infectados con VON han demostrado neutralización de anticuerpos por más de dos años posteriores a la exposición. Los títulos de neutralización de anticuerpos se desarrollan dentro de los 7-11 días post-infección en caballos con infección experimental, y en caballos infectados naturalmente en el brote de 1999, mantuvieron títulos de Neutralización de anticuerpos después de 15 meses post-infección (Seville, *et al.* 2003).

La ruta de neuroinvasión después de la infección con VON es controversial. Se sugiere que bajos niveles de viremias no pueden llegar a células endoteliales de replicación y el antígeno no se detecta en células endoteliales, una ruta alternativa por la cual estos virus podrían invadir el neuroepitelio olfativo es por transporte retrogrado axonal. El virus podría entonces diseminarse rápidamente a través del neuropilo a áreas sensitivas especialmente. El antígeno es raramente identificado en otro tejido equino como en los del SNC y áreas sensitivas como el tallo cerebral y cordón espinal (Seville, *et al.* 2003).

## 1.11 Signología

### 1.11.1 Caballos

En caballos la eVON es detectada raramente. Esta enfermedad neurológica en caballos es caracterizada principalmente por ataxia, mala coordinación y alteraciones de conducta. La afección se presenta en forma brusca con fiebre,

cefalea, linfadenopatía y erupción cutánea principalmente en el tronco (Saville, *et al.* 2003). En los casos más severos se observa parálisis de piernas, recumbencia, convulsiones y muerte. La tasa de casos fatales son 44% en Marruecos, 43% en Italia y 30-45% en EEUU. Los casos más graves se han observado meningoencefalitis y congestión y hemorragias de vasos cerebrales de tipo petequeal y equimótica en caballos (Komar, 2000; Cárdenas y Vargas, 2002).

En contraste, caballos afectados en Israel y EEUU frecuentemente exhibieron signos clínicos que envolvían cerebro y tronco cerebral, además de signos clínicos característicos de lesión en la medula espinal. Los signos clínicos más frecuentemente reportados en los EEUU incluyen ataxia [85%], debilidad [48%], recumbencia o dificultad al incorporarse o ambas [45%], fasciculación del músculo [40%], fiebre [23%], parálisis o flacidez del belfo [18%], y contracción facial o muscular [13%], rechinado de dientes [7%] y ceguera [5%]. Los signos corresponden a cerebro y medula espinal afectado en casos clínicos de Israel y EEUU a diferencia con los casos de Italia y Francia que solo afectaba la médula espinal. Estas diferencias atribuyen que hay diferentes cadenas de virus que afectan a diferentes países. La cadena del virus en los EEUU [NY99] es muy similar a la cadena de Israel [Is98] que fue aislada de un ganso. La cadena aislada a partir de caballos afectados en Italia y Francia es muy cercanamente parecida a la cadena del virus aislada en los brotes de 1996 en Rumania y en 1999 en Volgograd (Steffanus, 2000; Cárdenas y Vargas, 2002; Saville, *et al.* 2003).

### 1.11.2 Humanos

En humanos la eVON tiene un período de incubación de 3-6 días (Vargas y Cárdenas, 2002b) y es caracterizada como una enfermedad febril aguda (Diamond, *et al.* 2001) {alta 39.3° C, con una media de 39.1° C con un rango de 37-40.5° C} persistente {6 días, con un rango de 2-14 días} acompañada por dolor de cabeza frontal [55%], algo de tos, dolor de espalda, mialgia, artralgia, fatiga, conjuntivitis, dolor retrovulbar, salpullido maculopapular o rozado {en aproximadamente la mitad de los casos, extendiéndose por el tronco a las extremidades y cabeza, útiles en el diagnóstico precoz}, linfadenopatía,

sintomatología gastrointestinal {anorexia, náuseas, dolor abdominal, diarrea} y síntomas respiratorios {taquipnea}. Ocasionalmente {menos del 15% de casos} meningitis aguda aséptica o encefalitis {asociado a endurecimiento del cuello, vómito, confusión, disturbios de conciencia, somnolencia, temblor de las extremidades, reflejos anormales, convulsiones, paresia, y coma}, mielitis anterior, hepato-esplenomegalia, hepatitis, pancreatitis y ocurre miocarditis (Hubálek y Halouzka, 1999; Shieh, *et al.* 2000; Asnis, *et al.* 2000; Davis, *et al.* 2001; Tyler, 2001; Brinton, 2002; Pepperell, *et al.* 2003).

Al año 2000, se tenía un rango de fatalidad de la infección de 8.4% de los casos. La edad media de los casos fatales correspondían a 72 años, a pesar de que la enfermedad neurológica se presentaba en pacientes de todas las edades (Brinton, 2002; Vargas y Cárdenas, 2002b; Marr y Calisher, 2003). La meningoencefalitis es rara en personas jóvenes, pero esta incidencia es mayor en personas mayores de 50 años de edad (Petersen y Marfín, 2002; Nosal, Pellizari, 2003). Datos anteriores sugieren que la inmunodepresión pueden incrementar el riesgo de una enfermedad severa. Intensa debilidad muscular es un síntoma común y puede ser una pista en el diagnóstico. Reportes de parálisis flácida aguda sugiere diferencial con Síndrome de Guillain-Barré (Asnis, *et al.* 2000; Petersen, *et al.* 2002).

La recuperación es completa (más rápido en niños que en adultos, a veces acompañados por periodos largos de mialgias y malestar), y no ha sido reportada una secuela permanente (Hubálek, Halouzka, 1999). En la actualidad, no se ha aprobado ninguna terapia específica o vacuna para uso humano (Diamond, *et al.* 2003).

### 1.11.3 Aves

En aves la mortalidad y morbilidad es un indicador de emergencia. La evidencia de una infección natural en aves solo es el aislamiento del VON. En el caso de los Cuervo Hooded (*Corvus corone sardonius*) la mortalidad es del 100% y de House Sparrot (*Passer domesticus*) es de 79%. Se han reportado miocarditis

y esplenomegalia, principalmente en los casos de aves infectadas con VON (Steele, *et al.* 2000; Komar, 2000).

Las aves usualmente no muestran síntoma alguno cuando son infectados por VON. Sin embargo, la enfermedad natural debido a que ha sido detectada en palomas en Egipto, y la inoculación de ciertas especies aviarias ( palomas, pollos, patos, gaviotas y corvidos) causa ocasionalmente encefalitis y muerte o la persistencia durante largos periodos del virus. Los pollos de engorda pueden morir por causa del virus (Hubálek, Halouzka, 1999).

Las aves enfermas presentan varios signos, incluían postura anormal de la cabeza y cuello, ataxia, temblor, desorientación y visión inaparente. La mayoría de aves con estos síntomas mueren (Marr, Calisher, 2003).

Se detectaron 28 aves con signos obvios de la enfermedad, que incluían algunos passeriformes especialmente corvidos y gaviotas pico anillado. Los signos de enfermedad incluía letargia, plumas erizadas, postura inusual (Blue jays), incapacidad de levantar la cabeza (Gaviotas de pico anillado), y ataxia (Gaviota de pico anillado). en la mayoría de casos, los signos clínicos fueron seguidos por muerte dentro de las 24hrs. Las aves moribundas se les practico la eutanasia, aunque poco se encontraron moribundos debido a que la muerte ocurrió rápido. Se observaron hemorragias externas provenientes de la boca y cloaca, pero no se observaron en los cuervos americanos que murieron (Komar, *et al.* 2003).

#### **1.11.4 La eVON en otros Mamíferos**

La inoculación de cabras con VON dio como resultado en fiebre, aborto en ovejas, y poca encefalitis, a diferencia de una infección asintomático vista en cerdos y perros. Los conejos, ratas adultas albinas, y cerdos de Guinea son resistentes a la infección por VON, pero los ratones de laboratorio y los hámster Sirios son marcadamente susceptibles; algunas veces comienzan enfermos con una encefalitis fatal, siempre y cuando se hayan inoculado periféricamente. Roedores adultos estresados o inmunosuprimidos por el frío, aislamiento, ciclofosfamidias, corticosterona, o endotoxinas bacterianas contraen una encefalitis

fatal, siempre y cuando se le administre una cadena del VON atenuada. La inoculación de Rhesus y monos Bonnet (pero no cinomolgus ni chimpancés) causa fiebre, ataxia, y postración con encefalitis ocasional, temblor de extremidades, paresia o parálisis. La infección puede ser fatal o persistencia durante mucho tiempo en sobrevivientes (Hubálek y Halouzka, 1999).

## 1.12 Lesiones Patológicas

No se detectaron lesiones grandes en los caballos afectados en Italia; sin embargo, algunas fueron evidentes en los caballos afectados en los EEUU. Microscópicamente, todos los animales afectados tenían de poco a moderada encefalomiелitis no supurativa, principalmente en la médula espinal y el tallo cerebral bajo. La lesión afectó tanto la materia gris como la blanca, con la lesión más severa envolviendo las regiones torácicas y lumbares de la médula espinal. Moderadas a severas hemorragias en médula espinal son evidentes en algunos caballos. Las lesiones del tallo cerebral aparecen más afectadas en caballos afectados en los EEUU comparada con aquellos reportadas en Italia. Las lesiones del tallo cerebral envuelven e incluyen lesiones en el núcleo basal, materia gris del tálamo, cerebro medio, tallo cerebral bajo, y lateral y ventral cuernos de la médula espinal. La lesión más severa incluye neurofagia supurativa con pequeñas áreas de necrosis y restos celulares. En contraste con las lesiones asociadas con Encefalitis Equina del Este y Oeste, significantes cambios no fueron detectados en las cortezas cerebrales y cerebelares de caballos con Encefalitis del Virus del Oeste del Nilo. El antígeno del Virus del Oeste del Nilo no ha sido detectado en tejidos extraneurales de caballos afectados, lo cual es directamente contrastante a los hallazgos post-mortem en aves (Steele, *et al.* 2000; Bunning, *et al.* 2002; Saville, *et al.* 2003).

La reexaminación histopatológica de cuatro casos fatales en humanos variaron en el grado de necrosis neural en la materia gris, con infiltración de microglia y leucocitos polimorfo nucleares, degeneración neural, y neurofagia. Las lesiones histopatológicas fueron más prominentes en el tallo cerebral y cordón

espinal, lo cual podría explicar las manifestaciones clínicas de dolores musculares en algunos pacientes (Shieh, *et al.* 2000).

Estudios patológicos de humanos y primates infectados por VON muestran que el virus produce encéfalo mielitis de la materia gris, incluyendo la corteza cerebral, diencéfalo, cerebrales y cerebelares (Pepperell, *et al.* 2003).

### **1.12.1 Carga viral y Persistencia viral en órganos**

Aquellas aves que murieron de forma aguda se les realizó la necropsia para determinar la carga viral en diferentes órganos. Casi todos los órganos evaluados fueron infectados. En algunas especies de corvidos como cuervo americano y blue jays los títulos fueron mas altos a comparación de los Finches domésticos y Urracas de pico negro. Los títulos fueron bajos en las Gaviotas de pico anillado, pero todos los órganos fueron infectados (Komar, *et al.* 2003).

Las aves sobrevivientes se les realizó necropsia después de practicarles la eutanasia para determinar si el VON podría detectarse en alguno de los 11 órganos, incluyendo cerebro, ojo, riñón, corazón, bazo, hígado, pulmón, intestinos, gónadas, esófago, y piel. Este análisis determino que 18 de 41 aves muestreadas a los 14 días post infección manteniendo el virus en uno o mas órganos para mas de 13 días después de el periodo de viremia y en dos casos, en aves que no se detecto viremia, el órgano en el que se encontraron mas altos títulos fue el intestino, mientras en algunas otras especies no fue detectado (dos Gaviotas y dos Finches) (Komar, *et al.* 2003).

Nuestro estudio encontró que los anseriformes fueron malos hospederos reservorios para VON y es similar con los hallazgos en estudios hechos en Sudáfrica, en el cual se evaluaron tres especies de patos. La Rock Dove (paloma domestica) es considerada una candidata para monitorear la transmisión de VON, debido a que tienen una respuesta inmune muy fuerte y desarrollan niveles bajos de viremia (no infecciosa) (Komar, *et al.* 2003).

En una examinación patológica de 27 aves de 14 especies en 8 ordenes que fueron naturalmente infectadas con VON en la ciudad de New York de la colección zoológica en 1999 revelo una variedad de lesiones. La mas prominente

lesión fue gran hemorragia en el cerebro, esplenomegalia, y miocarditis. El virus se aisló de riñón [20/20], intestinos [13/14], corazón [4/25], cerebro [23/26], bazo [15/18], páncreas [10/12], adrenales [10/13], hígado [14/20], ovarios [4/8] y pulmón [5/12] (Steele, *et al.* 2000; Mc Lean, *et al.* 2002)..

De 3976 aves muertas muestreadas para VON en el estado de New York en el 2000, el 40% tenía, uno o mas signos compatibles con VON tales como emaciación, esplenomegalia, hepatomegalia, lesiones cardiacas y pericárdicas, o posibles signos de encefalitis, de estas solo fueron 53% positivas al virus (Mc Lean, *et al.* 2002).

Se llevaron para examinar 20 cuervos americanos muertos de New Jersey, USA, durante septiembre a octubre en 1999, 10 de ellos fueron encontrados positivos a VON. Fue aislado el VON en cultivos de células Vero, se aisló de cerebro(8/10), riñón (7/10) y corazón(6/9), por medio de PCR-TR se detecto en cerebro(10/10) y de riñón, hígado y pulmón (7/10) (Mc Lean, *et al.* 2002).

### **1.13 Diagnóstico**

El diagnóstico de el VON no puede basarse solo en hallazgos clínicos, deberán ser confirmados por el diagnóstico de laboratorio, este es complicado por la reacción cruzada que presenta con los miembros de su subgrupo como el virus de la Encefalitis Japonesa y otros más pertenecientes al mismo serocomplejo (Cárdenas y Vargas, 2002; Shieh, *et al.* 2000; Roehring, *et al.* 2003).

En México con la puesta a la venta de la nueva vacuna contra VON, en la detección de anticuerpos se deberá diferenciar entre anticuerpos de infecciones previas, vacúnales e inmunológicos (Cárdenas y Vargas, 2002).

#### **1.13.1 Serología**

El examen serológico del suero es vital para la confirmación del diagnóstico de VON (Lee, *et al.* 2002).

**1.13.1.1 Prueba de Reducción de Placas por Neutralización** - Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT)- es la prueba de elección, y es aplicable para una gran variedad de especies. Esta prueba se emplea para medir la capacidad de los anticuerpos de neutralizar la infectividad vírica. Adicionalmente, esta prueba es la más específica para diferenciar entre anticuerpos contra VON y Encefalitis de San Luis (ESL) (Pepperell, *et al.* 2003; Johnson, *et al.* 2003).

**1.13.1.2 Ensayo Inmunoenzimático** – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)- es una prueba apropiada pero únicamente en especies en las que ha sido validada (Tardei, *et al.* 2000). Por lo tanto, esta prueba presenta una aplicación limitada para especies de zoológico (Pepperell, *et al.* 2003). El uso de ELISA en la captura de IgM equina de VON indica que este es un método simple y eficiente para la detección del anticuerpo, y al mismo tiempo que la virus neutralización lo detecta (Bunning, *et al.* 2002; Pepperell, *et al.* 2003). En los humanos los títulos de anticuerpos [IgM] contra VON no tienen diferencia cuantitativa entre la fase aguda y de convalecencia [ELISA] (Roehring, *et al.* 2003). Aún con todas sus limitantes, el método más eficiente para diagnosticar VON, es la detección de IgM en suero o líquido cefalorraquídeo [LCR] (Petersen y Marfín, 2002; Hunt, *et al.* 2002).

**1.13.1.2.1 ELISA indirecto en aves:** La reciente prueba de ELISA indirecto multiespecie desarrollada en California para la detección de anticuerpos contra ESL y EEO, y modificada para VON en Nueva York, ha sido probada con varias especies de aves (passeriformes, galliformes, columbiformes, y anseriformes) (Mc Lean, 2002), también se desarrollo un antígeno detectable por ELISA del VON en pools de mosquitos, con una sensibilidad tan aceptable como el desarrollado en aves (Hunt, *et al.* 2002).

**1.13.1.3 Prueba de Anticuerpos fluorescentes** indirecta con muestras de suero de cualquier especie. Se han reportado reacciones inespecíficas con esta prueba (Mc Lean, *et al.* 2002; Hunt, *et al.* 2002).

**1.13.1.4 Inhibición de la Hemoaglutinación (HAI).** Esta prueba es aplicable a una gran variedad de especies, pero los resultados pueden no ser específicos para VON. Además, las propiedades particulares de sueros de algunas especies pueden afectar el desarrollo general de la prueba (Johnson, *et al.* 2003).

## **1.13.2 Aislamiento e identificación viral**

**1.13.2.1 Aislamiento viral.** Es la prueba “de oro” para la confirmación del diagnóstico etiológico. Debe ser realizado en todas las muestras apropiadas. El aislamiento viral determina si el ejemplar se encontraba virémico al momento de la toma de muestra (Cárdenas y Vargas, 2002; Mc Lean, *et al.* 2002).

**1.13.2.2 Inmunohistoquímica (IHC).** La IHC es una prueba de confianza para la detección del VON, particularmente en aves. Es necesaria la validación de la prueba en otras especies, por ejemplo, en equinos (Petersen, *et al.* 2002). Por medio de inmunohistoquímica la presencia del antígeno viral en las neuronas, procesos neurales y áreas e necrosis (Shieh, *et al.* 2000; Mc Lean, *et al.* 2002).

**1.13.2.3 Transcripción inversa de la Reacción en cadena de la polimerasa – Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction (RT-PCR)-** para detección de RNA viral en tejidos (Bernard, *et al.* 2001; Hunt, *et al.* 2002; Petersen, *et al.* 2002; Mc Lean, *et al.* 2002 Saville, *et al.* 2003)..

## **1.13.3 Estudio Comparativo**

Un estudio comparativo de seis pruebas para la detección de anticuerpos de VON en pollos infectados experimentales, los cuales incluía Hemagglutination-inhibition test (HIT), Inmunoglobulina G(IgG) indirect ELISA, el microtite virus neutralization, la standard plaque reduction neutralization test (PRNT), y el microtite PRNT (micro-PRNT) (Weingartl, *et al.* 2003). A pesar de que el micro-

PRNT es capaz de detectar los títulos más altos de anticuerpos durante infecciones tempranas así como en infecciones avanzadas, teniendo su pico de sensibilidad el día 7 post inoculación, debido a la complejidad y tiempo requerido en esta prueba es recomendado realizar una combinación de búsqueda de IgG e IgM por ELISA como pruebas serológicas, las muestras de suero que dieron resultados positivos en ELISA pueden comprobarse por medio de micro-PRNT a fin de determinar la especificidad de los anticuerpos a el Virus del Oeste del Nilo. Gracias a esto micro-PRNT es la prueba de elección para especies de las cuales los anticuerpos secundarios conjugados no estén disponibles (Weingartl, *et al.* 2003).

#### **1.13.4 Diagnóstico Diferencial**

El diagnóstico primario diferencial para Encefalitis por Virus del Oeste del Nilo es Botulismo, rabia, y Mieloencefalitis protozoal equina. Debido a cambios en el comportamiento asociados con hiperestesia y parálisis progresiva, la prueba de diagnóstico a la rabia deberá realizada en todos los caballos afectados que mueran o sean eutanasiados. En botulismo el principal signo clínico es debilidad con fasciculación del músculo; sin embargo, ataxia no debe presentarse. Esto puede ser difícil algunas veces para discernir; por lo tanto son necesarias tomas medidas precautorias. Otras enfermedades que se han considerado como diferenciales incluyen; mielopatía de la vértebra cervical, Herpes virus Equino 1, mieloencefalopatía, mielopatía degenerativa, y otras encefalopatías, tales como Encefalitis Equina Oriental, Oriental y Venezolana (Seville, *et al.* 2003).

En los Estados Unidos, la mayoría de casos de encefalitis aguda son causados por Virus del Herpes Simple [HSV], enterovirus y arbovirus. Los arbovirus que causan encefalitis en EEUU incluye San Luis, California, Equino Occidental, y Virus de la encefalitis Equina Oriental (Tyler, 2001; Lee, *et al.* 2002).

El tipo y combinación de pruebas de laboratorio usadas por varios laboratorios dependen sobre los objetivos del análisis, el tipo de espécimen recibido, la sensibilidad y especificidad necesaria, y la rapidez requerida. Los

recursos de un laboratorio y la disponibilidad de los reactivos pueden limitar los tipos de pruebas que use el laboratorio (Mc Lean, *et al.* 2002).

### 1.14 Tratamiento

En las infecciones virales en caballos, especialmente aquellas que resultan en condiciones neurológicas, el tratamiento es difícil debido a que solo es posible es tratamiento de soporte. Agentes antivirales, como ribavirin, interferón- $\gamma$ , y suero hiperinmune (algunas veces usado en humanos), puede ser de uso en caballos. Este tipo de tratamientos llega a ser muy costoso y no se han demostrado su eficacia aun. Uso de medicamentos antiinflamatorios tales como AINE's (Flunixin meglumine 1.1 mg/kg IV), esteroides (Dexametazona .1-.25 mg/kg IV o IM), y DMSO (1 g/kg en una solución al 10%), puede ayudar a minimizar la inflamación y dolor del SNC. El edema del SNC puede ser reducido con el uso de Manitol (.25-2 g/kg IV), y el daño oxidativo puede mitigarse con antioxidantes como vitamina E (5000 a 8000 UI/ d PO). Fluidos intra vasculares y nutrición parenteral puede ser necesaria si el caballo no puede comer y beber agua, debido a sus deficiencia neurológica o a patía. Si el caballo esta en recumbencia y no puede levantarse, requerirá ayuda para alzarse. Una sonda para alimentarse puede ser usada para administrar fluidos orales, nutrición de soporte y medicamentos. La evacuación de las heces puede ser necesario en caballos que no defecuen correctamente y antibióticos de amplio espectro podrían evaluarse en caballos en recumbencia para prevenir infecciones secundarias (Steffanus, 2000; Seville, *et al.* 2003). Se deben enfocar los esfuerzos sobre eVON, en la prevención y determinación si es que agentes como Inmunoglobulinas de VON e interferón alfa-2b previene o atenúa la enfermedad neurológica (Steffanus, 2000; Petersen y Marfín, 2002; Pepperell, *et al.* 2003).

En el caso de las aves la mayoría que desarrollan signología aparente con títulos de viremia de  $10^9$ UFP tienen un 100% de mortalidad, al igual de todas aquellas que desarrollaron sintomatología nerviosa (Marr, Calisher, 2003).

## 1.15 Medidas de Prevención y Control

Las Medidas de Prevención y Control, deberán ser enfocadas a cuatro puntos principales, para su éxito que son: Educación Pública, Control del Mosquito vector, Vacunación y Programas de Vigilancia, para asegurar un correcto control y prevención de cualquier brote de la eVON (Vargas y Cárdenas, 2002a; Lee, et al. 2002 Mc Lean, *et al.* 2002; Seville, *et al.* 2003 Nosal, Pellizari, 2003).

**1.15.1 Educación Publica:** El objetivo de la educación pública será concientizar a la población en general en cuanto a la disminución de riesgo de exposición al VON, mediante la reducción de actividades al aire libre entre el crepúsculo y el alba, vestir pantalones largos y manga larga en actividades al aire libre y horas de más actividad del mosquito, uso de repelentes naturales y químicos tópicos para evitar las picaduras del mosquito vector, así como también la colocación de mallas mosquiteras en puertas y ventanas de las casas, es importante la reducción de cuerpos de agua estáticos que puedan ser usados por los mosquitos como criaderos como: cubetas, canaletas, latas, recipientes, charcos, llantas viejas, y actividades tales como: limpiar jardines etc (Nosal y Pellizari, 2003; Lee, *et al.* 2002).

En el caso de caballos, además de reducir los posibles criaderos de mosquitos, los caballos deberán estar bajo techo en períodos de alta actividad de los mosquitos. Las luces deberán ser apagadas durante la noche y madrugada debido a que los mosquitos son atraídos hacia las luces. Deberán establecerse bulbos incandescentes alrededor del establo para atraer a los mosquitos lejos de los caballos. Las luces negras no atraen a los mosquitos muy bien. Las aves que estén cerca o dentro del establo deberán ser movidas para reducir reservorios potenciales. Hay preparaciones que contienen repelentes de mosquitos disponibles para caballos. El uso de ventiladores sobre los caballos en los establos puede ayudar a detener a los mosquitos. El uso de pesticidas asperjados en la noche en los establos ayuda a reducir los mosquitos, deberá usarse con

precaución por los caballos sobre todo por la dirección del aspersion (Saville, *et al.* 2003).

La Educación Pública se puede hacer a través del manejo de información en unidades de salud pública, sitios en la web, hot linees, etc. estos son métodos efectivos para informar al público acerca de los métodos de prevención, control del vector y horarios, y actualizaciones acerca de vigilancia del VON en el área (Nosal y Pellizari, 2003; Mc Lean, *et al.* 2002).

**1.15.2 Control del Mosquito Vector:** El principal vector para VON son las especies de mosquitos. Estos vectores son mejor controlados por programas de control que incluyan varias medidas de manejo que apoyarse en una sola acción. Disminución de fuentes, la eliminación o alteración del hábitat potenciales para larvas de mosquitos [como se comprobó ya en New York la importancia que tuvo en la erradicación de la malaria y en la disminución de casos por VON], limpiar lugares donde se acumule agua de las lluvias, etc (Mc Lean, *et al.* 2002; Nosal y Pellizari, 2003). El último componente en la prevención de la infección en humanos por VON es el control de mosquitos. Los conocimientos de la biología de los mosquitos y las condiciones locales serán usadas para escoger la mejor intervención [modificación del hábitat, manejo del agua, sanitización o uso de pesticidas] sobre sitios específicos (Shapiro y Micucci, 2003).

El control químico puede ser ocupado contra lavas, adultos o ambos y debería incluir esfuerzos en minimizar y monitorear el desarrollo de resistencia. La medida de control más ampliamente conocida es el uso de pesticidas. Los pesticidas son designados para atacar en 2 de los estados dentro del ciclo de vida del mosquito. Mosquitos inmaduros desarrollo desde huevos a larva a pupa en aguas estáticas, y desarrollo de pupa a adulto alado. Los agentes que trabajan en aguas estáticas contra larvas son denominados larvicidas, y aquellos que trabajan contra mosquitos alados son llamados adulticidas (Shapiro y Micucci, 2003).

**1.15.2.1 Larvicidas:** Los larvicidas tienen un número de ventajas sobre adulticidas. Se pueden usar en criaderos de mosquitos, lo que evita la aplicación en todo el vecindario o ciudad. Pueden ser aplicado en forma sólida [pellets,

granulado y en polvo], con limitada exposición a los humanos. Algunos agentes larvicidas son específicos a mosquitos y tienen relativamente poco impacto sobre el medio ambiente y salud humana. Hay preparaciones disponibles las cuales pueden prevenir el desarrollo de los mosquitos adultos por un mes, lo cual disminuye los costos (Shapiro y Micucci, 2003). Son usados a principios de primavera para reducir el número de mosquitos que eclosionarán. Administrados en cuerpos de agua estáticos donde favorecen la cría de mosquitos. Cada provincia regula la venta, el uso, transportación, almacenamiento y disposición. Los productos más comúnmente usados en Norteamérica como larvicidas son agentes biológicos *Bacillus thuringiensis var israelensis* [Bti] usado en Québec (Sibbald, 2001) y *Bacillus sphaericus*. Cualquiera de los dos larvicidas poseen poco riesgo a la salud humana al manejarlos indirectamente o en exposición directa a ellos como resultado del uso para control de mosquitos. Se han reportado una leve irritación en ojos y piel por el contacto directo con Bti (Shapiro y Micucci, 2003).y sintéticos como reguladores de crecimiento [methoprene] (Nosal y Pellizari, 2003). La toxicidad del methoprene a otro tipo de insectos y animales ocurre en concentraciones mucho más altas que las usadas para el control de mosquitos (Shapiro y Micucci, 2003). El Bti es menos tóxico que el methoprene pero tiene un espectro a menos número de especies de Mosquitos. Ambos larvicidas se degradan rápidamente en el medio ambiente (Shapiro y Micucci, 2003).

**1.15.2.2 Adulticidas:** Aun cuando es el último método de elección los adulticidas son los más ampliamente conocidos, se aplican a razón de volúmenes ultra-bajos [ULV] como spray de gotas extremadamente pequeñas de una camioneta o avión. El uso de adulticidas tiene una cobertura media en el control de VON. La aplicación de adulticidas a ULV trabajan en contacto directo con los adultos que estén volando. Una desventaja de los adulticidas es su efecto momentáneo y la necesidad de reaplicaciones. El uso de adulticidas debe ser reservado a la presencia de casos humanos de infección por VON o hallazgos en el medio ambiente [aves o mosquitos positivos a VON] que indican un alto nivel de riesgo

humano a la infección de VON por medio de mosquitos adultos (Shapiro y Micucci, 2003).

Los más conocidos son Resmethrin, una piretrina sintética, el cual solo se deberá usar solo si es absolutamente necesario (Sibbald, 2003), y malatión un organofosforado usado desde 1953 en Canadá. Entre los inhibidores de acetilcolina el malatión es el que se tiene conocimiento de ser más seguro. Los mamíferos tienen una mayor actividad de la carboxilesterasa que los insectos, lo cual proporciona una toxicidad selectiva hacia los insectos. La inhibición de la colinesterasa en humanos puede sobre estimular el sistema nervioso y provocar náusea, vértigo, confusión y a exposiciones altas (accidentes) parálisis respiratoria y muerte (Shapiro, 2003). Sin embargo, malatión es altamente tóxico a insectos, incluyendo abejas y a peces y invertebrados acuáticos (Nasal y Pellizari 2003; Shapiro, 2003), pero hacia aves y mamíferos no se considera riesgo debido a su baja toxicidad (Shapiro, 2003).

Prevenir la infección por VON, se debe balancear el riesgo de infección con el riesgo de exposición humana y medioambiental a los pesticidas usados para el control de mosquitos (Shapiro, 2003). No obstante, en regiones donde el mosquito porte el virus, menos del 1% de mosquitos son infectados y, de los casos humanos, menos del 1% presentarán enfermedad severa. De estos casos severos, el porcentaje de fatalidad es de 3-15% e incluye generalmente a gente anciana (Lee, *et al.* 2002).

Es posible reducir la probabilidad de transmisión por piquetes de mosquito, por medio del uso de repelentes para mosquitos, que contengan N,N-diethyl-m-toluamide (DEET), siendo este considerado como el más eficiente contra insectos hematófagos e incluso contra garrapatas (Vargas y Cárdenas, 2002c)

### **1.15.3 Vacuna contra VON**

La compañía biotecnológica Baxter/Inmuno (Austria) ha iniciado esfuerzos para desarrollar una vacuna humana inactivada con formalina. Fort Dodge Animal Health (USA) ha iniciado el desarrollo de dos vacunas una inactivada con

formalina y otra con un plásmido DNA para caballos. La tecnología del DNA fue desarrollada en los Centros de Control y Prevención de enfermedades, Ft. Collins (CO, USA) y un estudio en caballos en la Universidad del Estado de Colorado, demostró protección contra desafío del virus. Lusting et al produjeron un virus vivo atenuado, aislado de un derivado a partir de pasajes empíricos de una cadena tipo silvestre en células de mosquitos *Aedes egypti*. Una dosis de el virus atenuado mostró 100% de protección en ratones y gansos con inoculación intracraneal al reto de la enfermedad, un tipo silvestre homólogo a VON. Una vacuna DNA para la expresión de genes prME de VON solo protege a caballos pero es probable que se necesiten varias dosis. Considerando la posibilidad de una regreso espontáneo a su virulencia, debido al porcentaje alto de mutación de los virus RNA, una vacuna de cadenas vivas atenuadas no es tan segura como una vacuna prME de VON DNA. Además, la vacuna prME DNA de VON produce solo anticuerpos contra las proteínas de la membrana codificado en el plásmido, de esta manera no se presentarán las respuesta a genes virales no estructurales, típica de infecciones naturales (Davis, et al.2001; Arroyo, et al. 2001; Saville, et al. 2003).

Se recomienda que la administración de la vacuna del VON será inicialmente en dos dosis una a las 3 semanas y otra a las 6 semanas y luego anualmente. En algunas áreas, puede ser necesario vacunar más de una vez al año, particularmente en áreas en las cuales es mayor la presencia del mosquito o es todo el año o cuando, los caballos están sometidos a alto estrés como transporte, exposiciones o carreras. Basado en los hallazgos, es recomendable que la segunda dosis de la serie inicial anual deberá ser administrada durante las 4 semanas antes de la temporada del mosquito (Saville, et al. 2003).

#### **1.15.4 Programas de Vigilancia**

A partir de recientes brotes de eVON se han activado programas de Vigilancia tanto pasivos como activos, para evaluar la dinámica de transmisión y epidemiología de la eVON, en estados unidos se comenzaron las tareas de vigilancia en el 2000, casi al mismo tiempo el estado de Ontario promovió un

protocolo para monitorear la posible diseminación del virus hacia sus provincias (Lee, *et al.* 2002), en México se comienzan programas de vigilancia en el 2001 (Vargas y Cárdenas, 2002b).

#### **1.15.4.1 Vigilancia en Vertebrados**

Los programas de vigilancia en vertebrados son realizados para obtener calidad y cantidad de información acerca de la presencia, distribución, intensidad, y fluctuaciones en la actividad del VON (Mc Lean, *et al.* 2002).

La información puede ser colectada examinando especímenes que no hayan sido solicitados o que estaban destinados a otro propósito (sistema pasivo), o específicamente solicitando información, o activamente colectando y examinando especímenes vertebrados capturados con destino del programa de vigilancia (sistema de vigilancia activo). El tipo apropiado de vigilancia puede variar ampliamente dependiendo de la localización geográfica, condiciones ambientales, ecología, virus y huéspedes vertebrados relacionados, específica habilidad o disponibilidad de recursos, y la necesidad de su uso. Diferentes especies son candidatos como apropiados candidatos para diferentes tipos de vigilancias y la especie apropiada puede variar entre áreas geográficas. Para todos los tipos de vigilancia, las especies usadas deberán ser picadas del vector y deben ser infectadas por la picadura del mosquito. En EEUU esta disponible una Guía para vigilar arbovirus (Mc Lean, *et al.* 2002).

La vigilancia para VON fue establecida en EEUU en abril del 2000 e incluía la reexaminación de aves, mosquitos, pollos centinelas, animales domésticos, y humanos con encefalitis y meningitis aséptica. Vigilancia pasiva de aves muertas remitidas para ser examinadas particularmente sensibles a cadenas Isr98 del VON circulante en los EEUU, debido a la alta mortalidad en determinadas especies asociándose con la infección del VON. La vigilancia activa se estableció para detectar la presencia y monitorear la actividad del VON en aves silvestres y centinelas. Apoyo de la vigilancia veterinaria, principalmente en caballos, sirvió

como un sistema de monitoreo de la actividad del VON fuera del ciclo de transmisión ave-mosquito (Mc Lean, et al. 2002).

#### **1.15.4.2 Vigilancia en Humanos**

Mediante un programa de vigilancia activa que consistía en la asignación de coordinadores en hospitales centinelas para identificar pacientes, quienes se encuentren sospechosos {fiebre y diferentes niveles de conciencia [encefalopatías], con o sin debilidad muscular}. Durante el mismo periodo, se distribuyo en toda la provincia material educacional y los registros de pacientes examinadas para VON, constituyeron la vigilancia pasiva (Lee, *et al.* 2002).

Health Canadá organizó un programa de vigilancia para que fuera adoptado por las provincias del este de Alberta (a) Educar al staff a cerca del virus y hallazgos clínicos, (b) Reporte todos los casos sospechosos de meningitis, encefalitis y demasiada debilidad muscular, (c) para esto se enviarían los sueros al laboratorio para ser examinados y formar un banco con muestras de Líquido Ceforraquídeo (LCR), (d) iniciar una campaña de concientización a cerca de las medidas preventivas para disminuir la posibilidad de infección. El objetivo de esta vigilancia activa fue la detección temprana de pacientes infectados por VON hospitalizados con encefalopatía (Lee, *et al.* 2002).

#### **1.15.4.3 Vigilancia de Aves Muertas**

La vigilancia pasiva mediante aves muertas de vida libre fue poco sensible y efectiva en la detección de la presencia temporal y expansión geográfica de la actividad del VON en EEUU en el 2000. Este sistema pasivo fue mejorado mediante el reporte y consignación de las aves muertas, a través de la educación y otros programas. Los datos de aves muertas han sido registrados antes de la detección de casos clínicos de VON en humanos o en ganado domestico(Caballos) y antes de mosquitos positivos. La vigilancia de la mortalidad

aviar, es mas útil en el sistema de detección temprana del VON (Bernard, *et al.* 2001; Mc Lean, *et al.* 2002).

Son notorias las desventajas que tiene este método de vigilancia, incluyendo la variabilidad en detección de enfermos o aves muertas, depende de la conciencia e interés del publico, la mortalidad de aves en un sitio no se debe confundir con el sitio de infección, problemas asociados con transporte marítimo, manipulación, proceso u examinación o numero del las muestras. El uso de reporte de aves muertas por el publico disminuye si la conciencia y el interés disminuye (Mc Lean, *et al.* 2002).

#### **1.15.4.4 Vigilancia por Aves Centinelas**

Vigilancia activa en free-ranging y aves en cautiverio son usadas para detectar la presencia de VON y monitorear la actividad del virus anual y temporal. En este sistema un poco mortalidad en respuesta de la infección podría ser importante, junto con el desarrollo de niveles detectables de anticuerpos. El centinela ideal seria aquel fácil de atrapar repetitivamente, fácil de manejar, y seria suficientemente robusto para manejarlo y sangrarlo sin causarle daño. Si la presencia de el virus en un área requiere que las especies sean picadas por el vector [que la actividad del ave coincida espacial y temporalmente con la del vector], esto seria mas apropiado, mientras que en sistemas de prevención temprana para infecciones humanas, serian mas apropiadas especies que vivan en contacto directo con los humanos (Mc Lean, *et al.* 2002).

A pesar de resultados experimentales indicando que los pollos son candidatos como centinelas para el VON, el uso de centinelas pollos para vigilancia de VON en los EEUU durante el 2000 tuvo muchas limitaciones. Solo 13 de los pollos centinelas seroconvirtieron a VON en el estado de New Jersey y New York, a pesar de la intensa transmisión entre silvestres, a ves free-ranging y las positivas fueron primero detectados después de los casos humanos ocurridos. En Sudáfrica el uso de palomos domésticos facilito la tarea de centinelización de la

transmisión del VON, lo cual podría ser considerado como una alternativa (Mc Lean, *et al.* 2002; Johnson, *et al.* 2003).

#### **1.15.4.5 Vigilancia Veterinaria**

La vigilancia veterinaria para VON (ganado) ha sido recomendada en los EEUU. Esta incluye un tipo de vigilancia pasiva en la cual las autoridades veterinarias promuevan concientización referente a el riesgo asociado a la enfermedad del VON en los caballos entre los dueños de caballos y practicantes de salud equina dentro de su jurisdicción (Mc Lean, *et al.* 2002).

La vigilancia veterinaria activa entre centinelas yeguas ha sido propuesta en algunas jurisdicciones. La seroconversión en estas yeguas seria una señal de incremento de riesgo de la transmisión del virus a equinos, y posiblemente a otros mamíferos tales como el humano. Aun de que la vigilancia veterinaria es importante para valorar el impacto de VON sobre la salud del ganado, la vigilancia aviar seria mejor para indicar el riesgo local de la transmisión del VON antes de la detección de la enfermedad en equinos. En la vigilancia para la encefalitis usando otras especies además del caballo, no es considerada prioritariamente, aun cuando en los EEUU algunas otras especies de mamíferos han contraído infecciones fatales de la cadena del VON NY99, esto incluye conejos domésticos (Mc Lean, *et al.* 2002).

#### **1.15.5 Reducción de la Población de Vertebrados**

El control de poblaciones de hospederos vertebrados con el propósito de prevenir epizootias o epidemias urbanas por virus transportados por artrópodos, ha sido sugerida pero en realidad esto no es un método eficiente para controlar la transmisión de la enfermedad, además de ser menos efectivo, menos aceptable es mucho mas caro que el control del vector. Esto puede llevar a la disminución de especies peri domésticas, disminuyendo la posibilidad de la presencia de una epizootia pero no eliminan el riesgo para los humanos. La

realidad es que el control de las poblaciones de aves es impráctica y no usual (Mc Lean, *et al.* 2002).

### **1.16 Impacto Económico**

El impacto económico de la eVON no ha sido evaluado profundamente. Sin embargo, otros estudios de costos de otras encefalitis arbovirales serían aplicables para VON. El hallazgo de un caso único de Encefalitis Equina del Este (EEE) en un infante podrían pasar los US\$3 millones, se considera una justificación fuerte para los programas de vigilancia activa para EEE en USA. Una estimación del gasto público atribuido a el brote de VON en el estado de New York en 1999 sobrepasó los US\$15 millones. Costos adicionales en el brote de USA incluyen aquellos que resultaron de embargos internacionales de barcos que transportaban caballos hacia EUA, incluyendo la salida portuaria de caballos de New York (Komar, 2000).

### **1.17 Aves Migratorias y el desplazamiento del VON en América**

Las aves migratorias ha sido indicado como el principal huésped introductor del VON en nuevas regiones debido a: los brotes en regiones templadas por lo regular suceden durante el verano y principios del otoño (Malkinson y Banet, 2002), coincidiendo con la llegada de grandes concentraciones de aves migratorias, y mosquitos; estos brotes siempre ocurren en humanos que viven cerca de humedales donde una alta concentración de aves tiene contacto con muchos mosquitos ornitofílicos; El principal vector del cual se ha aislado el virus son principalmente mosquitos ornitofílicos (*Culex univittatus* en el Medio Oriente y *Cx pipiens* en Europa); anticuerpos contra el virus han sido encontrados en sangre de muchas aves migratorias en Eurasia; las aves migratorias han sido ligadas a la transportación del Virus en el Hemisferio Occidental; VON ha sido aislado de aves con actividad migratoria tales como: Barred Warbler (*Sylvia risoria*) en Chipre y Turtle Dove (*Streptopelia turtur*) en Eslovaquia; viremia durante suficiente tiempo para infectar a mosquitos vectores, ha sido reportado en varias especies de aves;

y lugares de migración importantes en stress de las aves. El stress ha sido comprobado la inmunosupresión que causa, lo cual favorece la replicación viral en roedores (Rappole *et al.* 2000). Además , los brotes en humanos ocurrieron en sitios urbanos cerca de humadales, donde las aves migratorias, mosquitos ornitofílicos, y humanos conviven (Mateos, 2002; Rappole *et al.* 2000; Rappole y Hubálek, 2003).

El papel tan importante que juegan las aves migratorias en el transporte de los virus ha sido documentado en varios virus, como Virus de la Encefalitis del Occidente y Virus de la Encefalitis Equina del Este, que tienen ecología y biología viral similar. En la epidemia de Encefalitis Equina del Este en Jamaica, el virus fue transportado por aves que provenían de Estados Unidos (Lord y Calisher, 1970; Mateos, 2002; Rappole JH;2000).

### **1.17.1 Rutas Migratorias en América**

Son cuatro rutas las que siguen las aves para llegar y pasar a través del área de New York en finales del verano y principios de otoño, que ponen en riesgo a países vecinos como México: la Ruta Sureste de los EEUU, Ruta del Circular del Golfo, la Ruta Trans-Golfo y la Ruta Occidental Islas del Caribe-Atlántico Norte (Rappole *et al.* 2000).

#### **1.17.1.1 Ruta del Sureste de los EEUU**

Miembros de aproximadamente 155 especies de aves pasan a través del área de New York siendo este su camino para invernar en el sureste de los Estados Unidos, siguiendo la ruta descrita por *WW Cooke* para el Robin (*Turdus migratorius*). La mayoría de estas especies no son hospederos ideales desde la perspectiva del virus, porque ellos siguen una migración individual y no llegan a muchos habitats con altas concentraciones de mosquitos ornitofílicos. El European starling (*Sturtus vulgaris*), normalmente considerado por ser sedentario, es un ejemplo de especies de las poblaciones del noreste que siguen esta ruta. Los cuervos americanos son otra de estas especies, tal como el pato salvaje (*Anas*

platyrhynchos). La reproducción de los patos salvajes se lleva a cabo en regiones templadas y región Boreal de Norteamérica y, al final del verano, miembros de poblaciones del este de Canadá comienzan reunirse en bandadas preparándose para migrar a sitios de hibernación al sur de los Estados Unidos. Muchos patos salvajes del Noreste de EEUU también migran hacia el Sureste de EEUU. Después de la hibernación o durante el desplazamiento hacia el norte en la primavera, los machos buscan pareja, vuelan unidos, el pato sigue su pareja de vuelta a su área natal, este patrón se ha visto en muchas especies de patos y gansos (Rappole et al. 2000).

### **1.17.1.2 Ruta Circular del Golfo**

Algunas especies que típicamente hibernan en México y América Central posiblemente cruzan grandes distancias de aguas abiertas; estas especies incluyen halcones, garzas y airones así como algunos patos y gaviotas. A pesar de que algunas aves pueden volar directamente a través del Golfo de México a sus lugares de hibernación, otros desvían su curso en el Golfo, pasando a lo largo de las costas del oeste durante ambas jornadas migratorias, hacia el sur y hacia el norte. Aproximadamente 11 de estas especies posiblemente se reúnen en los humedales de New York durante la migración y en tierras de hibernación. Un ejemplo es el Herring Gull (*Larus argentatus*) (Rappole et al. 2000).

### **1.17.1.3 Ruta Trans-Golfo**

Aproximadamente 125 especies de aves tienen poblaciones que transitan la región de New York para llegar a sus tierras de hibernación en México y América Central siguiendo esta ruta en el otoño. Datos de distribución indican que muchos no siguen la misma ruta norte en la primavera, pero toman una ruta más al oeste paralelamente al oeste de las costas del Golfo. Asimismo, muchas aves de estas especies, especialmente aves jóvenes o aquellas de poblaciones del centro del continente, siguen ambas rutas circular del Golfo la norte y la sur. A pesar de eso este grupo incluye muchas aves migratorias que se reproducen en el oriente de

Norteamérica, solo aproximadamente 12 especies pueden servir como acarreadores del VON, por que la mayoría migran solas y no hacen paradas largas ni se alimentan en bandadas en el invierno o durante la migración (Rappole et al. 2000).

#### **1.17.1.4 Ruta Occidente de las Islas del Caribe y Atlántico Norte**

Aproximadamente 70 especies de aves tienen poblaciones que pasan por New York y cruzan el oeste del Atlántico Norte o Mar del Caribe en la ruta sur a sus áreas de hibernación en las Islas del Caribe o en Sudamérica. Como la patrón de trans-Gulfo, esta ruta es elíptica, con aves siguiendo más al oeste cruzando el Golfo de México o a lo largo de la costa oeste en la primavera. Miembros de aproximadamente 22 especies de aves que llegan a reunirse durante la migración y durante el invierno siguen esta ruta (Rappole et al. 2000).

México posee una diversidad muy amplia en fauna silvestre y a nuestro país cada año arriban aves provenientes de zonas norte y sur del continente utilizando a México como escala de su viaje ya sea en busca de hábitats de hibernación o crianza, y con ellas la posibilidad de transportar enfermedades que afecten a las poblaciones humanas y animales del país, es por ello la importancia de el monitoreo de aves migratorias silvestres en otoño e invierno para detectar la posible entrada de alguna enfermedad emergente, así como la implementación continua del control de mosquitos. Además avicultores, comerciantes de aves, zoológicos y otros incluyendo transportadores de aves deberán examinar las aves contra VON durante la cuarentena para garantizar que no se está trayendo o enviando aves infectadas (Rappole et al. 2000; Rappole y Hubálek, 2003).

# MARCO DE REFERENCIA

## Estado de Durango

El estado de Durango se encuentra colindando al norte con Chihuahua y Coahuila de Zaragoza; al este con Coahuila de Zaragoza y Zacatecas; al sur con Zacatecas, Nayarit y Sinaloa; y al oeste con Sinaloa y Chihuahua. Sus coordenadas geográficas extremas son: Al norte 25°50', al sur 22° 17' de latitud norte; al este 102°30', al oeste 107°09' de longitud oeste. El estado de Durango representa el 6.3% de la superficie del país.

Consta de 29 municipios en total, los municipios en los que se realizó el trabajo fueron: Melchor Ocampo y Esfuerzos Unidos pertenecientes a el municipio de Nuevo Ideal, así como también las localidades de Ejido Medina y 5 de Febrero ambos del Municipio de Canatlan

Las coordenadas geográficas extremas de Nuevo Ideal son al Norte 25°07', al Sur 24°33' de latitud Norte; al este 104°43', al oeste 105°19' de longitud oeste. Dentro del estado de Durango Representa el 1.5% de la superficie total, se encuentra a 1990msnm. El municipio de Nuevo Ideal tiene colindancias al Norte con los municipios de Santiago Papasquiaro y Coneto de Comonfort; al este con los municipios de Coneto de Comonfort y Canatlán; al sur con el municipio de Canatlán; al oeste con el municipio de Santiago Papasquiaro.

## Municipio de Nuevo Ideal : Esfuerzos Unidos y Melchor Ocampo

El Municipio de Nuevo Ideal tiene las siguientes coordenadas geográficas extremas: 24°49' de latitud Norte y de Longitud Oeste 104°59', se encuentra a una altitud de 1980 msnm.

## Clima

El clima más predominante es el Semiseco templado con una superficie de 57.84% de la superficie del municipio, siguiéndole el Templado subhúmedo con

lluvias en verano, de menor humedad con un 13% de la superficie, también otros tipos de climas dentro del municipio representando la superficie restante del municipio como lo es el Templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (10.39%), Semifrí subhúmedo con lluvias en verano, e mayor humedad (10.50%), Semifrí subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (8.27%).

### **Temperatura Promedio Anual**

La temperatura media anual registrada es de 17.1-17.3, y la precipitación promedio anual es de 711.3-437mm.

### **Cuerpos de agua**

Laguna de Santiaguillo

### **Agricultura y Vegetación**

Agricultura 32.19% de la superficie municipal (Maíz, Frijol, Avena, Girasol), Pastizal 16.71% (Zacate Navajita, banderilla, navajita velluda, tres barbas, pelillo), Bosque 35.5% (Pino Chino, prieto, real, piñonero, Encino blanco), Matorral 11.22% Huizache, Gatuño, Duraznillo, Nopal Blanco, Panalero).

### **Uso potencial de la tierra**

Uso agrícola (Mecanizada continua 43.78%, No aptas para la agricultura 56.22%).

Uso pecuario (Para el desarrollo de praderas cultivadas 43.77%, Para el aprovechamiento de la vegetación de pastizal .12%, Para el aprovechamiento de la vegetación natural diferente del pastizal 6.76%, Para el aprovechamiento de la vegetación natural únicamente por el ganado caprino 41.52%, No aptas para uso pecuario 7.83%).

## **Municipio de Canatlan : Ejido Medina y 5 de Febrero**

El Municipio de Canatlan tiene las siguientes coordenadas geográficas extremas: Norte 24°51' y Sur 24°12' de latitud Norte; al Este 104°27' y Oeste 105°30' de Longitud OE, se encuentra a una altitud de 1960 msnm.

### **Clima**

El clima más predominante es el Semiseco templado con una superficie de 46.61% de la superficie del municipio, siguiéndole el Semifrío subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad con un 22.33% de la superficie, también otros tipos de climas dentro del municipio representando la superficie restante del municipio como lo es el Templado subhúmedo con lluvias en verano, de menor humedad (22.04%), Templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (7.19%), Templado subhúmedos con lluvias en verano, de mayor humedad (1.83%).

### **Temperatura Promedio Anual**

La temperatura media anual registrada es de 17.6-16.0, y la precipitación promedio anual es de 711.3-437mm.

### **Cuerpos de agua**

Laguna de Santiaguillo

### **Agricultura y Vegetación**

Agricultura 16.95% de la superficie municipal (Maíz, Frijol, Manzana), Pastizal 20.38% (Zacate Navajita, banderilla), Bosque 39.77% (Pino Chino, prieto, piñonero, real), Matorral 20.23% Nopal, Sotol, Manzanita, Otros 2.67%.

### **Uso potencial de la tierra**

Uso agrícola (Mecanizada continua 18.0%, de Fracción animal continua 5.61%, M anual continúa 8.12%, No aptas para la agricultura 68.20%).

Uso pecuario (Para el desarrollo de praderas cultivadas 17.44%, Para el aprovechamiento de la vegetación de pastizal 1.94%, Para el aprovechamiento de

la vegetación natural diferente del paltzal 18.8%, Para el aprovechamiento de la vegetación natural únicamente por el ganado caprino 49.18%, No aptas para uso pecuario 12.56%).

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Tamaño de muestra y repeticiones**

El tamaño de la muestra y el número de repeticiones será indeterminada, ya que dependerán del número de muestras serán determinadas por el éxito de caza que se tenga.

### **Fases del Experimento**

El presente trabajo se llevo a cabo en tres fases que fueron: fase de campo (recolección de aves y Toma de muestra de encéfalo) y la de laboratorio (aislamiento viral)

#### **Fase de Campo:**

Se realizaron cinco muestreos, en los que consistía en la obtención de especímenes de aves acuáticas por medio de cacería, la captura de estas aves se realizó conforme al acuerdo del Instituto de Ecología, en cuanto a cacería deportiva, se utilizó una escopeta de diferentes calibres y modelos, excepto las de cañón de longitud inferior a 635 mm. (25"), y las de calibre superior al 12 (.729" ó 18.5 mm.), una vez muertas las aves se procedió a la recolección de las mismas y separación de la cabeza del cuerpo para posteriormente realizar la extracción del encéfalo. En esta fase se obtuvieron 67 cabezas de aves acuáticas de las cuales solo 48 pudieron ser enviadas a laboratorio ya que muchas de ellas fueron desechadas debido a el tipo de arma utilizada había ocasiones que destrozaban la cabeza o simplemente no era posible obtener el encéfalo por el deterioro del órgano.

La toma de muestra de Encéfalo se realizó de acuerdo con el Manual para toma de muestras publicado por el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, mismo apegado a lo establecido en la NOM-033-ZOO-1995, que norma el Sacrificio Humanitario de Animales Domésticos y Silvestres.

Para la toma de muestra de encéfalo se utilizó: Bisturí, tijeras de cirugía o pinzas. Para la extracción del encéfalo, se utiliza un bisturí o las tijeras para separar la cabeza del cuerpo del ave. Retirar la piel de la cabeza y quitar la tapa del cerebro para hacer la extracción. También pueden extraerse algunos otros órganos del ave, como los riñones, bazo e hígado. La muestra de órgano se envía en un frasco que contenga formol al 10 % y cubrir totalmente la muestra y después se introduce en una hielera con hielo seco o suficiente refrigerante para mantener la muestra en buenas condiciones hasta que llegue al laboratorio de la CPA.

### **Fase de Laboratorio**

Aislamiento viral se realizó en el laboratorio de la CPA (Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales) Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Col. Palo Alto, Delegación Cuajimalpa, C.P. 05110, México D.F.

El procedimiento utilizado para el aislamiento viral e interpretación de la misma es:

Cuando se trate de órganos, se deberá cortar el tejido en trozos pequeños con tijeras estériles y homogeneizar con un triturador de tejidos tipo Tenbroeck o con un mortero, utilizando caldo triptosa fosfatado a una concentración de peso/volumen.

Cuando se trate de hisopos o heces, se les deberá añadir caldo triptosa fosfatado a una concentración de peso/volumen.

Posteriormente, para cualquiera de los tres tipos de muestras antes señalados, se someterán al procedimiento siguiente:

a) Centrifugar a 2500 rpm. durante 20 minutos; decantar y filtrar por membrana millipore de 0.45  $\mu$ ;

**b)** Inocular cinco embriones de 9 a 11 días de edad con 0.2 ml del sobrenadante por vía amnio-alantoidea;

**c)** Examinar los embriones con un ovoscopio por lo menos cada 24 horas. Los embriones que mueran en 24 horas se consideran muertos por traumatismo. Generalmente el virus VON mata a los embriones entre los dos y siete días post-inoculación, por lo que todos los embriones que mueran después de las 24 horas, deberán conservarse en refrigeración a 4°C para pruebas posteriores.

El fluido amnio-alantaoideo de los embriones muertos, tiene niveles suficientes de hemoaglutininas para producir la aglutinación de eritrocitos de pollo. Esta propiedad provee una base conveniente y sencilla para la identificación del virus mediante la aglutinación en placa y la inhibición de la hemoaglutinación por un suero monoespecífico.

**d)** Obtener fluido amnio-alantoideo de cada embrión muerto utilizando una jeringa para tuberculina.

**e)** Colocar 0.050 a 0.100 ml de fluido en tres sitios diferentes sobre una placa de vidrio.

**f)** La primera gota será únicamente fluido amnio-alantoideo, a la segunda añadir un volumen igual de suero negativo y a la tercera antisuero contra el VON (suero positivo), mezclar bien utilizando palillos de madera diferentes para cada gota e incubar de tres a cinco minutos a temperatura ambiente.

**g)** Añadir a cada una de las suspensiones 0.050 a 0.100 ml de eritrocitos lavados de pollo al 5 %, mezclar con palillos. Mover la placa suavemente por 10 a 15 segundos y observar si hay hemoaglutinación. Los casos positivos hemoaglutinan rápidamente.

**h)** Si la muestra es positiva se observará hemoaglutinación en la suspensión de fluido más eritrocitos y en la de fluido más suero negativo más eritrocitos y además se presentará una inhibición de la hemoaglutinación en el fluido más suero contra VON más eritrocitos, como se representa en el siguiente cuadro:

Mezcla Aglutinación de Eritrocitos

Fluido problema + eritrocitos Positiva o negativa Fluido problema + suero contra VON + eritrocitos Positiva o negativa VON conocido + eritrocitos Positivo VON

conocido + suero contra VON + eritrocitos Negativo. Los embriones muertos después de las 24 horas se ponen en refrigeración mínimo 30 minutos, para una obtención más fácil del fluido alantoideo libre de eritrocitos que puedan alterar la lectura de la reacción. Posteriormente, se examina únicamente el fluido amnio-alantoideo de color claro o ligeramente rojizo. Si se utilizan fluidos hemolizados o contaminados se pueden presentar reacciones falsas-positivas. El VON es un contaminante en el laboratorio; por lo tanto se deberán tomar precauciones para evitar la contaminación de las muestras en proceso.

## RESULTADOS

En el presente estudio se obtuvieron 48 muestras de encéfalo, pertenecientes a gansos migratorios que arribaron a el estado de Durango, en los municipios de Canatlan y Nuevo Ideal, las especies de gansos colectadas fueron 16 gansos frente blanca (*Anser albifrons*), 23 gansos nevados (*Chen caerulescens*) y 9 gansos de Ross (*Chen rossii*), solo se muestrearon estas especies debido a que la recolección de aves migratorias por medio de cacería, está reglamentada y en la presente temporada solo se autorizó la cacería de estas especies, por lo que el presente muestreo está apegado al permiso otorgado por la SEMARNAP, que especifica las especies y el período en el que se debe realizar la cacería.

El estudio se dividió en 5 muestreos (Cuadro 2), para la recuperación de aves migratorias, logrando 66 aves de las tres diferentes especies, de las cuales solo 48 aves fueron aptas para enviar las muestras de encéfalo a laboratorio, debido a que las 18 aves restantes fueron eliminadas por daño físico excesivo, ya sea por el impacto de las postas, al momento de cobrar las piezas por medio de perros o por el transporte a el lugar donde se extrajo el encéfalo.

Todas las 48 muestras de encéfalo enviadas al laboratorio de alta seguridad de la CPA, fueron negativas a el aislamiento viral. Siendo esta una prueba de diagnóstico 100% confiable, se considera en este estudio que todas las aves recolectadas eran libres de Virus del Oeste del Nilo.

**Cuadro 2.-** Número de muestras obtenidas en los 5 muestreos realizados

<b>Muestra</b>	<b>Fecha</b>	<b>Aves Recolectadas</b>
1°	1 de Febrero del 2004	21
2°	15 de Febrero del 2004	9
3°	22 de Febrero del 2004	6
4°	8 de Marzo del 2004	9
5°	13 de Marzo del 2004	3

**Cuadro 3.-** Resultados obtenidos de los cinco muestreos realizados

<b>Num.</b>	<b>Estado</b>	<b>Localidad</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre Común</b>	<b>Fecha (d-m-a)</b>	<b>Resultado de Laboratorio</b>
1.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	1-2-04	Negativo
2.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	1-2-04	Negativo
3.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	1-2-04	Negativo
4.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	1-2-04	Negativo
5.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	1-2-04	Negativo
6.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	1-2-04	Negativo
7.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	1-2-04	Negativo
8.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	1-2-04	Negativo
9.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	1-2-04	Negativo
10.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	1-2-04	Negativo
11.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	1-2-04	Negativo
12.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	1-2-04	Negativo
13.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	1-2-04	Negativo
14.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	1-2-04	Negativo
15.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	1-2-04	Negativo
16.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	1-2-04	Negativo
17.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	1-2-04	Negativo
18.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen rossii</i>	Ganso de Ross	1-2-04	Negativo
19.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen rossii</i>	Ganso de Ross	1-2-04	Negativo
20.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen rossii</i>	Ganso de Ross	1-2-04	Negativo
21.	Dgo.	Melchor Ocampo	<i>Chen rossii</i>	Ganso de Ross	1-2-04	Negativo
22.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	15-2-04	Negativo
23.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	15-2-04	Negativo

24.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	15-2-04	Negativo
25.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	15-2-04	Negativo
26.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	15-2-04	Negativo
27.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	15-2-04	Negativo
28.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Chen rossii</i>	Ganso de Ross	15-2-04	Negativo
29.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Chen rossii</i>	Ganso de Ross	15-2-04	Negativo
30.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Chen rossii</i>	Ganso de Ross	15-2-04	Negativo
31.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	22-2-04	Negativo
32.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	22-2-04	Negativo
33.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	22-2-04	Negativo
34.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	22-2-04	Negativo
35.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	22-2-04	Negativo
36.	Dgo.	Esfuerzo Unido	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	22-2-04	Negativo
37.	Dgo.	Ejido Medina	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	8-3-04	Negativo
38.	Dgo.	Ejido Medina	<i>Chen rossii</i>	Ganso de Ross	8-3-04	Negativo
39.	Dgo.	Ejido Medina	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	8-3-04	Negativo
40.	Dgo.	Ejido Medina	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	8-3-04	Negativo
41.	Dgo.	Ejido Medina	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	8-3-04	Negativo
42.	Dgo.	Ejido Medina	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	8-3-04	Negativo
43.	Dgo.	Ejido Medina	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	8-3-04	Negativo
44.	Dgo.	Ejido Medina	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	8-3-04	Negativo
45.	Dgo.	Ejido Medina	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	8-3-04	Negativo
46.	Dgo.	5 de Febrero	<i>Chen caerulescens</i>	Ganso Nevado	13-3-04	Negativo
47.	Dgo.	5 de Febrero	<i>Anser albifrons</i>	Ganso frente blanca	13-3-04	Negativo
48.	Dgo.	5 de Febrero	<i>Chen rossii</i>	Ganso de Ross	13-3-04	Negativo

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El monitoreo de aves migratorias por medio de cacería, se clasifica dentro de un tipo de vigilancia pasiva debido a que las aves cazadas de los cuales se tomaron las 48 muestras de encéfalos, eran aves con un fin cinegéticos lo cual contribuye a evitar el daño a la biodiversidad de nuestro país, ya que las poblaciones de aves son vigiladas constantemente para poder determinar la cantidad de ellas que se podrán utilizar, por tal motivo el uso de este deporte para la obtención de información epidemiológica a cerca de la distribución de enfermedades que puedan ser transportadas por las aves, es de suma utilidad, debido a las ventajas que presenta este tipo de vigilancia; el correcto aprovechamiento de las poblaciones de aves silvestres migratorias y sobre todo la posibilidad de una retroalimentación directa con las personas que realizan esta actividad a cerca del riesgo en el que se encuentran.

En el presente estudio todas las 48 muestras de encéfalo enviadas al laboratorio de alta seguridad de la CPA resultaron negativas a la presencia del VON, esto no indica que toda la población de la temporada invierno-primavera 2004 se encuentre libre de VON, ya que es de suma importancia estudios mas amplios en lugares donde arriban mayor número de aves silvestres acuáticas, mismas con ellos aumenta la probabilidad de posibles casos positivos.

Estudios anteriores han demostrado el papel tan importante que juegan las aves migratorias en la diseminación de enfermedades, en este estudio no se logró comprobar nuestra hipótesis, lo cual nos indica la necesidad de llevar a cabo más estudios sobre este tipo de poblaciones aviares.

## LITERATURA CITADA

- Abbassy M, Osman M, Marzouk AS. 1993. West Nile (FLAVIVIRIDAE: *flavivirus*) experimentally infected *argas* ticks (ACARI: ARGASIDAE). Am. J. Trop. Med. Hyg. 48(5):726-737.
- Anderson JF, Andreadis TG, Vossbrinck CR, Tirrell S, Wakem EM, French RA, Garmendia AE, Kruijning HJV. 1999. Isolation of West Nile Virus from Mosquitoes, Crows, and a Cooper's Hawk in Connecticut. Science. 286 (17): 2331-2333.
- Arroyo J, Miller CA, Catalan J, Monath T. 2001. Yellow fever vector live-virus vaccines: West Nile virus vaccine development. TRENDS in Molecular Medecine. 7 (8): 350-54.
- Asnis D, Conetta R, Teixeira AA, Waldman G, Sampson BA. 2000 The West Nile Virus Outbreak of 1999 in New York: The Flushing Hospital Experience. Clin. Inf. Dis. 30: 413-8.
- Baqar S, Hayes CG, Murphy JR, Watts DM. 1993. Vertical transmission of West Nile Virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 48 (6): 757-762.
- Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kauffman EB, Ebel GD, Dupuis II AP, Kiet AN, Eidson M, White DJ, Shi PY, Kulasekera VL, Eidson M, White DJ, Nicholas DC, Young DM, Stone WB, NY State West Nile Virus Surveillance Team, Kramer LD. 2001. West Nile Virus Infection in Birds and Mosquitoes, New York State, 2000. Emerging Infectious Diseases. 7 (4): 679-84.
- Brinton MA. 2002. The Molecular Biology of West Nile Virus: A New Invader of the Western Hemisphere. Annu. Rev. Microbiol. 56:371-402.
- Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis Bs, Komar N, Godsey MS, Hettler DBDL, Holmes DA, Biggerstaff BJ, Mitchell CJ. 2002 Experimental Infection of Horses with West Nile virus. Emerging Infectious Diseases. 8(4): 1-19
- Cárdenas L J, Vargas GR. 2002. Epidemiología de la EON en equinos en los EE.UU. Imagen Veterinaria UNAM. 2:22-25.

- CENAVE 2004 <<www.cenave.gob.mx>>
- Corwin A, Habib M, Watts D, Darwish M, Olson J, Botros B, Hibbs R, Kleinosky M, Lee HW, Shope R, Kilpatrick M. 1993. Community-Based prevalence profile of Arboviral, Rickettsial, and Hantaan-Like viral antibody in the Nile River Delta of Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48 (6): 776-783.
- Davis B, Chang GJJ, Cropp B, Roehring JT, Martin DA, Mitchell CJ, Bowen R, Bunning M. 2001. West Nile Virus Recombinant DNA Vaccine Protects Mouse and Horse from Virus Challenge and Expresses In Vitro a Noninfectious Recombinant Antigen That Can Be Used in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Virology.* 75 (9): 4040-4047.
- Diamond MS, Shrestha B, Marri A, Mahan D, Engle M. 2003. B Cells and Antibody Play Critical Roles in the Immediate Defense of Disseminated infection by West. *Journal of Virology.* 74 (4): 2578-2586.
- Dohm DJ, Sardelis MR, Turell MJ. 2002 Experimental Vertical Transmission of West Nile Virus by *Culex pipiens* (*Diptera: Culicidae*). *J. Med. Entomol.* 39(4): 640-644.
- Estrada FJG, Navarro LR, Beasley DWC, Coffey L, Carrara S, Travassos da Rosa A, Clements T, Wang E, Ludwig GV, Campomanes CC, Paz RP, Tesh RB, Barret ADT, Weaver SC. 2003. West Nile Virus in México: Evidence of Widespread Circulation since July 2002. *Emerging Infectious Disease.* 9 (12): 1-4.
- Hubálek Z, Halouzka J. 1999. West Nile fever -a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Disease.* 5 (5): 643-50.
- Hunt AR, Hall RA, Kerst AJ, Nasci RS, Savage HM, Panella NA, Gottfried KL, Burkhalter KL, Roehring JT. 2002 Detection of West Nile virus antigen in Mosquitoes and Avian tissues by a Monoclonal antibody-based capture Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology.* 40 (6): 2023-2030.
- Johnson AJ, Langevin S, Wolff KL, Komar N. 2003. Detection of anti-West Nile virus immunoglobulin M in Chicken serum by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (5): 2002-2007.

- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. 2003. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases* 9 (3): 311-322.
- Komar N. 2000. West Nile Viral encephalitis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19(1): 166-176.
- Lanciotti R, Roehring JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, Mac Kenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund, Schmitt B, Malkinson M, Banet, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, Mc Namara T, Gubler DJ. 1999. Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Science*. 286 (17): 2333-2337.
- Lee FJE, Fearon M, Leber C, Dwinhg P, Myszak M, Cole B, Greene PB, Artes S, McGeer A, D’Cunha C, Naus M, The Ontario West Nile Virus Working Group. 2002 Human surveillance for West Nile virus infection in Ontario in 2000. *Canadian Medical Association Journal*. 166 (1): 29.
- Li W, Kedersha N, Anderson, Emara M, Swiderek KM, Moreno GT, Brinton MA. 2002. Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3’stem-loop of the West Nile Virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *Journal of Virology* 76 (23): 11989-12000.
- Lord RD, Calisher CH. 1970. Further evidence of southward transport of arboviruses by migratory birds. *American Journal of Epidemiology*. 92(1):73-78.
- Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Larichev V, Gaidamovich SY, Vyshemirsky OI, Zhukov AN, Lazorenko VV, Salko VN, Kovtunov AI, Galimzyanov KhM, Platonov AE, Morozova TN, Khutoretskaya NV, Shishkina EO, Skvortsova TM. 2000. Isolation of Two Strains of West Nile Virus during an Outbreak in Southern Russia, 1999. *Center for Disease Control and Prevention*. 6 (4):1-4

- Malkinson M, Banet C. 2002 The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 267: 309-3239.
- Marr JS, Calisher CH. 2003 Alexander the Great and West Nile Virus Encephalitis. *Emerging Infectious Disease*. 9 (12):1-5.
- Mateos PA. 2002. Las aves en la diseminación del virus de la EON y el riesgo para México. *Imagen Veterinaria*. UNAM. 2: 16-21.
- Mc Lean RG, Ubico SR, Komar N. 2002. West Nile virus in livestock and Wildlife. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 267: 271-308.
- Montaña HJA. 2002 El virus de la fiebre del Oeste del Nilo. *Imagen Veterinaria UNAM* 2: 7-10.
- Nathan DB. 1994. Stress and Infectious Disease. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 49 (3): 105-112.
- Nosal B, Pellizzari R. 2003 West Nile virus. *Canadian Medical Association Journal* 168(11):1443-1444.
- Pepperell C, Rau N, Krajden S, Kern R, Humar A, Mederski B, Simor A, Low DE, McGeer A, Mazzulli T, Burton J, Jaigobin C, Fearon M, Artsob H, Drebot MA, Halliday W, Brunton J. 2003 West Nile virus infection in 2002: mobility and mortality among patients admitted to hospital in south-central Ontario. *Canadian Medical Association Journal* 168(11): 1399-1405.
- Petersen LR, Marfin AA. 2002 West Nile virus: A primer for the Clinician. *Ann of Int. Med.* 137 (3): 173-179.
- Petersen LR, Roehring J.T. 2001 West Nile virus: A reemerging global pathogen. *Rev. Biomed.* 12: 208-216.
- Petersen LR, Roehring JT, Hughes JM. 2002. West Nile Virus Encephalitis. *N. Engl. J. Med.* 347 (16): 1225-1226.
- Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z. 2000. Migratory Birds and Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Emerging Infectious Diseases*. 6 (4): 1-11.
- Rappole JH, Hubálek Z. 2003 Migratory birds and West Nile virus. *Journal of Applied Microbiology* 94 (1): 47-58.

- Roehring JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS, Campbell GL. 2003. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. *Emerging Infectious Diseases*. 9 (3): 376-379.
- Rosen L. 1988. Further observations on the mechanism of vertical transmission of Flaviviruses by *Aedes* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39 (1): 123-126.
- Sampson BA, 2001 West Nile encephalitis: the neuropathology of four fatalities. *Ann N Y Acad. Sci.* 951:172-8.
- Saville WJ, Sofaly CD, Toribio RE. 2003. West Nile virus encephalitis in horses. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 25(3): 220-227.
- Shapiro H, Micucci S. 2003. Pesticide use for West Nile virus. *Canadian Medical Association Journal* 168 (11): 1427-1430.
- Shieh WJ, Guarner J, Layton M, Fine Annie, Miller J, Nash D, Campbell GL, Roehring JT, Gubler DJ, Zaki SR. 2000. The Role of Pathology in an Investigation of an Outbreak of West Nile Encephalitis in New York, 1999. *Emerging Infectious Disease*. 6(4):1-2.
- Sibbald B. 2001. Quebec clears way use of aerial pesticides to combat West Nile virus. *Canadian Medical Association Journal*. 165 (4): 463.
- Sibbald B. 2003. Larvicide debate marks start of another WEST Nile virus summer. *Canadian Medical Association Journal*. 168 (11): 1455.
- Steele K, Linn MJ, Schoepp RJ, Komar, Geisbert TW, Manduca RM, Calle PP, Taphel BL, Panella NA, Mc Namara TS. 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.
- Steffanus D. 2000. West Nile Attacks U.S. Horses. *Equine Practice*. 22 (1): 22-23.
- Tamayo RR, 2000. Virus del Nilo Occidental: Aspectos e epidemiológicos y clínicos. *Biblioteca Virtual de Vigilancia en Salud*. 5:6.

- Tardei G, Ruta S, Chitu V, Rossi C, Tsai TF, Cernescu C. 2000. Evaluation of Immunoglobulin M(IgM) and IgG Enzyme Immunoassays in Serologic Diagnosis of West Nile Virus Infection. *J. Clin. Microbiology*. 38: 2232-2239.
- Tyler KL. 2001. West Nile Virus Encephalitis in America. *The New England Journal of Medicine*. 344 (24): 1858-1859.
- USDA 2000. Enfermedades Exóticas de los Animales. 1ª Edición. United States Animal Health Association. 11-16.
- Vargas R, Cárdenas LJ, Mateos PA, Montañó HJA. 2002. La enfermedad del Oeste del Nilo. *Imagen Veterinaria UNAM* 2: 5-6.
- Vargas R, Cárdenas LJ. 2002a. Vigilancia epidemiológica de la EON en el continente americano. *Imagen Veterinaria UNAM* 2:30-33.
- Vargas R, Cárdenas LJ. 2002b. Epidemiología de la EON en humanos en el continente americano. *Imagen Veterinaria UNAM* 2: 26-29.
- Vargas R, Cárdenas LJ. 2002c. Mosquitos ornitofílicos transmisores de la encefalitis del Oeste del Nilo en el mundo. *Imagen Veterinaria UNAM* 2: 11-15.
- Wang T, Anderson JF, Magnarelli LA, Wong SJ, Koski RA, Fikrig E. 2001 Immunization of Mice Against West Nile Virus with Recombinant Envelope Protein. *The Journal of Immunology*. 167:5273-77.
- Weingartl HM, Drebot MA, Hubálek Z, Halouzka J, Andonova M, Diberdardo A, Cottam-Birt C, Larence J, Marszal P. 2003. Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in chicken serum. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 67 (2): 128-132.