

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



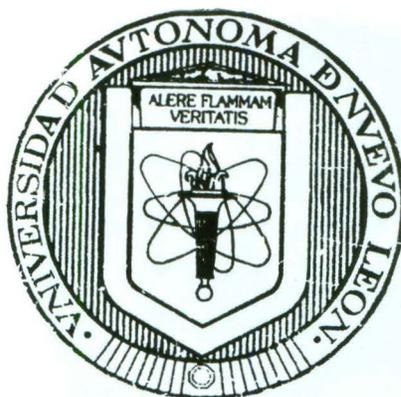
ANÁLISIS LONGITUDINAL DEL VIRUS DEL GESTE  
DEL NIÑO EN AVES, EQUINOS Y MOSQUITOS  
DEL NORESTE DE MÉXICO (2001-2004)

POR  
BIOL. DARWIN EDUARDO ELIZONDO GARCÍA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
EN ENTOLOGÍA MÉDICA

ENERO 2007

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS LONGITUDINAL DEL VIRUS DEL OESTE  
DEL NILO EN AVES, EQUINOS Y MOSQUITOS  
DEL NORESTE DE MEXICO (2001 - 2004)

POR:  
BIOL. DARWIN EDUARDO ELIZONDO QUIROGA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN ENTOMOLOGIA MEDICA

ENERO 2007

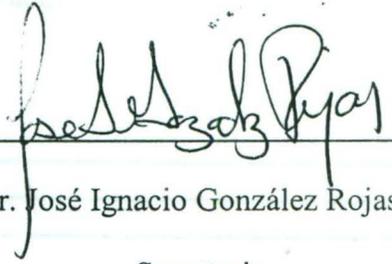
ANÁLISIS LONGITUDINAL DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN AVES,  
EQUINOS Y MOSQUITOS DEL NORESTE DE MÉXICO (2001-2004)

Comité de tesis.



Ildefonso Fernández Salas, Ph.D.

Director de Tesis



Dr. José Ignacio González Rojas.

Secretario



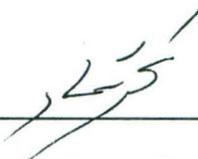
Dr. Roberto Mercado Hernández.

Vocal



Dra. Adriana Flores Suárez.

Vocal

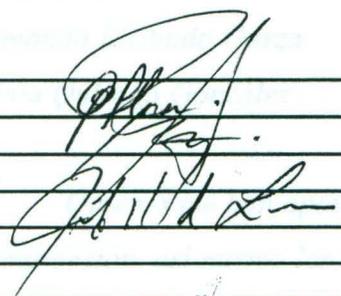


Dr. Gustavo Ponce García.

Vocal

**ANALISIS LONGITUDINAL DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN AVES,  
EQUINOS Y MOSQUITOS DEL NORESTE DE MÉXICO (2001-2004)**

Comité Académico de Doctorado.

  
A set of ten horizontal lines with two handwritten signatures in black ink. The first signature is a cursive name, and the second is a more stylized signature.

---

**Subdirector de Estudios de Postgrado**

## DEDICATORIA

### ***A Mis Padres:***

*Armando Elizondo Garza*

*Sonia Quiroga González*

*Quienes me han apoyado durante toda mi vida y me han brindado amor, cariño y comprensión, así mismo les doy gracias por todas esas noches que no han dormido solo pensando en mi bien, a ellos mi amor y gratitud infinita por siempre.*

### ***A mi Hermano:***

*Dr. Armando Elizondo Quiroga*

*Por todas las cosas que he aprendido de él, tanto en lo cotidiano como en lo profesional y al mismo tiempo por la colaboración en la realización de este trabajo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo para la realización de mis estudios de Doctorado con especialidad en Entomología Médica (Becario No. 176958)

A the University of Texas Medical Branch (UTMB) por su apoyo en la realización de esta investigación (Fogarty International Training Grant Application).

### **A Mis Maestros:**

Integrantes de mi comité de tesis a quienes les quiero expresar mi gratitud: Ildefonso Fernández Salas Ph.D., Dr. José Ignacio González Rojas, Dr. Roberto Mercado Hernández, Dra. Adriana Flores Suárez, y Dr. Gustavo Ponce García, por toda la ayuda, consejos, y enseñanza brindada por, sin los cuales este trabajo no se habría realizado.

A el MD. Robert B. Tesh, Dr. Hilda Guzmán, Dr. Amelia Taravatsos da Rosa, Alan Barret Ph.D., y Todd Davis, pertenecientes a UTMB por todas las enseñanzas compartidas y los sabios consejos.

A Dickie Elizondo y su esposa Irma Montfor quienes fueron un gran apoyo cuando estuve en el extranjero.

A la QBP. Gabriela González Olvera por toda la amistad y cariño compartido, además de toda la ayuda brindada en la redacción del presente trabajo.

A Dr. Armando E. Elizondo Quiroga, QBP Rosa Maria Sanchez Casas, Saúl Lozano Fuentes, PhD., MC. Karla Saavedra, Ing. Aarón Medina Sánchez, M.V.Z Luis Arturo Ibarra Juárez, MC. Yuri O. Ayala Sulca, Biol. Pedro Mis Ávila, MC. Aldo Ortega Morales, Biol. Gabriel Ruiz Ayma, QBP. Israel Garza Garza, Biol. Ma. Guadalupe Reyes Solís, Biol. Amanda Cavazos Álvarez, Biol. Armando Jiménez Camacho, Biol. Mario Guerrero Madriles, además a todas y cada una de las personas que participaron en este proyecto directa o indirectamente y sus nombres fueron omitidos por mi mala memoria.

## TABLA DE CONTENIDO

### CAPITULO I

Sección	Pág.
1. RESUMEN GENERAL.....	2
1.1 ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCION GENERAL.....	4
2.1 Sintomatología.....	5
2.2 Estructura del WNV.....	5
2.3 Métodos de Diagnóstico.....	6
2.4 Epidemiología.....	7
2.5 El papel de las aves.....	8
2.6 Mosquitos vectores involucrados.....	8
2.7 Epizootias en equinos.....	9
2.8 Amenaza a la salud pública del WNV Nuevo León.....	10
3. JUSTIFICACIÓN Y ORIGINALIDAD.....	12
4. LITERATURA CITADA.....	14

### CAPITULO II

1. RESUMEN.....	17
2. INTRODUCCION.....	18
3. HIPOTESIS.....	20
4. OBJETIVOS.....	20
4.1 Objetivo general.....	20
4.1.2 Objetivos específicos.....	20
5. ANTECEDENTES.....	22
5.1 Epidemias Históricas del WNV.....	22
5.2 Ecología del virus.....	23

5.3	Monitoreo en Aves.....	24
5.4	Migración de aves y dispersión del virus.....	26
5.5	Rutas Migratorias.....	30
5.5.1	Ruta del Sureste de Estados Unidos.....	30
5.5.2	Ruta que circunda el Golfo de México.....	30
5.5.3	Ruta que atraviesa el Golfo de México.....	31
5.5.4	Ruta de las Islas Caribeñas Noroeste del Atlántico.....	31
5.6	WNV en Equinos.....	32
5.7	Vigilancia Epidemiológica en Equinos.....	33
5.8	Equinos como Hospederos Terminales.....	34
5.9	Prueba de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	35
6.	MATERIAL Y METODO.....	36
6.1	Áreas de Estudio.....	36
6.2	Nuevo León.....	37
6.2.1	Zona Norte.....	37
6.2.2	Zona Centro.....	38
6.2.3	Zona Sur-Este.....	38
6.3	Tamaulipas.....	39
6.4	Coahuila.....	40
6.5	Colecta de aves.....	41
6.6	Colocación de las redes de niebla.....	42
6.7	Toma de muestra en aves.....	43
6.8	Muestreo en caballos.....	43
6.8.1	Toma de muestra.....	43
6.9	Procesamiento de las muestras en laboratorio.....	44
6.10	Técnica de ELISA.....	44
6.10.1	Análisis de las OD.....	45
7.	RESULTADOS.....	47
7.1	Aves colectadas.....	47
7.1.2	Aves Seropositivas para WNV.....	57
7.1.3	Procesamiento Conjunto de Datos de Aves.....	66
7.2	Muestreo en caballos.....	72
7.2.1	Caballos seropositivos.....	73
7.2.2	Procesamiento Conjunto de Datos de equinos.....	78
8.	DISCUSIONES.....	81
9.	CONCLUSIONES.....	86
10.	LITERATURA CITADA.....	87

11. APENDICE.....	92
-------------------	----

### CAPITULO III

1. RESUMEN.....	97
2. INTRODUCCION.....	98
3. HIPOTESIS.....	100
4. OBJETIVOS.....	101
5. ANTECEDENTES.....	102
5.1 Aislamiento y monitoreo de WNV en mosquitos.....	102
5.2 Efecto de la temperatura sobre el WNV y otros arbovirus.....	104
5.3 Transmisión vertical del WNV y otros arbovirus.....	105
5.4 Comparación de los métodos de detección y transmisión experimental del WNV.....	106
5.5 Genoma viral.....	108
6. MATERIAL Y METODO.....	109
6.1 Descripción del área de estudio.....	109
6.2 Colecta de Mosquitos.....	110
6.3 Aislamiento del Virus.....	112
6.3.1 RT-PCR y Secuenciación.....	114
7. RESULTADOS.....	116
7.1 Colecta de Mosquitos.....	116
7.1.2 Mosquitos positivos.....	120
8. DISCUSIONES.....	124
9. CONCLUSIONES.....	127
10. LITERATURA CITADA.....	129

## LISTA DE TABLAS

### CAPITULO I

TABLA		Pagina
I	Distribución del Serocomplejo del Virus de la Encefalitis Japonesa.....	4

### CAPITULO II

I	Numero de ejemplares colectados y el orden al que pertenecen en los tres estados muestreados.....	48
II	Lista de Familias y numero de ejemplares colectados por estado y ordenados filogenéticamente, durante el periodo de estudio.....	49
III	Localidades de colecta para los estados de Tamaulipas (Tamps), Nuevo León (N.L.), y Coahuila (Coah): Números de colectas realizadas por localidad (No. Col.), número de individuos (No. Individuos) y Porcentaje (%).....	51
IV	Número y porcentaje de aves residentes y migratorias y su incidencia por estado.....	53
V	Lista de especies de aves, relación residentes- migratorias, para los estados del Noreste de México: Tamaulipas (1), Nuevo León (2), y Coahuila (3) en orden filogenético.....	54
VI	Lista de aves seropositivas para WNV mediante la prueba de ELISA para los estados del Noreste de México, ordenadas filogenéticamente.....	60
VII	Número y porcentaje de aves residentes y migratorias seropositivas por estado.....	61
VIII	Relación de aves residentes/migratorias seropositivas para WNV en Tamaulipas.....	62
IX	Relación de aves residentes/migratorias seropositivas para WNV en Nuevo León.....	63

X	Relación de aves residentes/migratorias seropositivas para WNV Coahuila.....	63
XI	Parámetros del análisis de frecuencias (tablas cruzadas) del resultado de la prueba de ELISA en aves en el estado de Tamaulipas, contrastado con las variables de espacio (localidad), tiempo (mes), y status (residente, migratorio y ambos).....	67
XII	Parámetros del análisis de frecuencias (tablas cruzadas) del resultado de la prueba de ELISA en aves en el estado de Nuevo León, contrastado con las variables de espacio (localidad), tiempo (mes), y status (residente, migratorio y ambos).....	69
XIII	Parámetros del análisis de frecuencias (tablas cruzadas) del resultado de la prueba de ELISA en aves en el estado de Coahuila, contrastado con las variables de espacio (localidad), tiempo (mes), y status (residente, migratorio y ambos).....	71
XIV	Total de muestras de suero de equinos colectados en los Estados de Nuevo León y Coahuila, de Diciembre del 2002 a Mayo del 2004.....	72
XV	Total de muestras de suero de equinos colectados en los Estados de Nuevo León y Coahuila, de Diciembre del 2002-Mayo del 2004 positivos por ELISA a WNV y su porcentaje de seropositividad por año.....	73
XVI	Localidades con muestras seropositivas y número de positivos.....	74
XVII	Parámetros del análisis de frecuencias (tablas cruzadas) del resultado de la prueba de ELISA en caballos con las variables de espacio (localidad, estado) y tiempo (mes).....	79

### CAPITULO III

I	Mosquitos Culícidos capturados por los diferentes métodos de captura Los datos se presentan como numero de capturados y porcentaje de capturados.....	116
---	---	-----

II	Mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i> capturados por los diferentes métodos de captura. Los datos se presentan como numero de capturados y porcentaje de capturados totales n=238.....	117
III	Especies de mosquitos capturados en los Municipios de Guadalupe, Escobedo y Pesquería, N. L., México, los datos se presentan como especies capturadas.....	118
IV	Resumen de los mosquitos colectados en los Municipios de Guadalupe, Escobedo y Pesquería, N. L., México, durante Junio del 2003-Septiembre 2004, que fueron analizados para la detección del WNV.....	119
V	Diferencias en Nucleótidos y aminoácidos en los genes de prM-E de aislamientos de México y Texas comparados la cadena de West Nile Virus WN-NY99 (382-99).....	122

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO I

Figura		Pagina
1	Distribución del Serocomplejo del Virus de la Encefalitis Japonesa.....	6

### CAPITULO II

1	Mapa de los Estados que conforman el noreste de México, y los municipios donde se realizaron las colectas tanto de aves como de suero de caballos.....	36
2	Mapa de los municipios donde se realizaron las colectas tanto de aves como de suero de caballos.....	41
3	Formula de Hall para obtener los porcentajes de inhibición de la técnica de ELISA.....	46
4	Numero de aves seropositivas a WNV para los estados del Noreste de México.....	57
5	Mapa resaltando los puntos de colecta con aves seropositivas en el 2003 para Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas.....	58
6	Mapa resaltando los puntos de colecta con aves seropositivas en el 2004 para Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas.....	59
7	Porcentaje de aves residentes/migratorias seropositivas por estado.....	62
8	Porcentaje de seropositividad en las áreas de colecta (representadas por fecha) en el 2003 para los tres estados...	65
9	Porcentaje de seropositividad en las áreas de colecta (representadas por fecha) en el 2004 para los tres estados....	66

10	Se presentan el número de aves colectadas contrastadas con las localidades de de colecta en Tamaulipas. La $X^2$ fue de 99.949 con una $p < 0.001$ mostrando dependencia y asociación altamente significativa.....	67
11	Número de aves colectadas positivas y negativas contrastadas con los meses de colecta en Tamaulipas. La $X^2$ fue de 124.074 con una $p < 0.001$ mostrando dependencia y asociación altamente significativa.....	68
12	Número de aves colectadas positivas y negativas contrastadas con las localidades de de colecta en Nuevo León. La $X^2$ fue de 79.883 con una $p < 0.001$ mostrando dependencia y asociación altamente significativa.....	69
13	Número de aves colectadas positivas y negativas contrastadas con los meses de colecta en Nuevo León. La $X^2$ fue de 70.370 con una $p < 0.001$ mostrando dependencia y asociación altamente significativa.....	70
14	Se presentan el número de aves colectadas contrastadas con las localidades y los meses de colecta en Tamaulipas. La $X^2$ fue de 21.483 con una $p < 0.001$ .....	71
15	Porcentaje de seropositividad en Coahuila en el 2002 en los tres municipios de colecta.....	75
16	Municipios de Nuevo León con caballos seropositivos a WNV en colectas realizadas de Febrero a Julio en el 2003 y su porcentaje de seropositividad por colecta.....	76
17	Municipios en el Estado de Nuevo León con equinos seropositivos a WNV y porcentaje de seropositividad por localidad.....	77
18	Mapa resaltando los sitios de colecta de equinos para el 2004 en el estado de Nuevo León, en donde todos tuvieron caballos positivos.....	78
19	Se presentan las frecuencias de los caballos contrastadas con la variable de la localidad para Nuevo León. La $X^2$ fue de 142.979 con una $p < 0.001$ .....	79

## CAPITULO I

### INTRODUCCION GENERAL

## 1. RESUMEN GENERAL

Las epidemias en los Estados Unidos de la Encefalitis del Oeste del Nilo en el Verano del 2002, mostraron un patrón de dispersión geográfica hacia la frontera Sur, específicamente Texas y Luisiana. Considerando esto y que el ciclo natural de la transmisión de esta enfermedad involucra aves migratorias que pasan por nuestro estado en su camino hacia Centro y Sudamérica, así como también las especies de mosquitos presentes en el Noreste de México son vectores del Virus del Oeste del Nilo (WNV) por lo tanto se propuso el desarrollo de este análisis longitudinal en el que se planteamos los siguientes objetivos: 1.- Monitorear y diagnosticar la presencia de WNV, en aves de los estados de Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas (Noreste de México) por medio de la prueba de ELISA de bloqueo en donde se obtuvieron 1,686 aves colectadas, de las cuales el 5.33 % resultaron seropositivas a este virus. Objetivo 2.- Monitorear y diagnosticar la presencia de WNV, en equinos de los estados de Nuevo León y Coahuila, y el resultado fue: de 498 caballos muestreados el 23.29% resultaron seropositivos para el WNV por la prueba de ELISA. Objetivo 3.- Monitorear y diagnosticar la presencia de WNV, en mosquitos del estado de Nuevo León y el resultado fue: de 2,297 mosquitos colectados se encontró un .047% de infección con WNV del cual se logro el aislamiento viral. El WNV está presente en el Noreste de México, además las aves residentes colectadas fue donde se encontró mayor frecuencia de seropositividad, lo que indica que los mosquitos de la región se infectaron al alimentarse de aves migratorias y a su vez infectaron a las aves residentes al mismo tiempo que equinos de la región.

## 1.1 ABSTRACT

The outbreaks in USA of West Nile encephalitis in the summer of 2002 showed a geographical spread pattern southward, specifically Texas and Louisiana. Considering this aspect and also the natural cycle of this disease transmission that involve migratory birds which pass across our state in its pathway to Center and South America, as well as the presence of mosquitoes species in the Northeast of Mexico are vectors of West Nile Virus (WNV) therefore it was established the development of this longitudinal analysis in which there are the next objectives: 1.-Surveillance and diagnosis for the presence of WNV in birds from the states of Nuevo Leon, Tamaulipas, y Coahuila (Northeast of Mexico) by means of blocking ELISA test. Were captured a total of 1,686 birds, from which 5.33% were positive to this virus. Objective 2.- Surveillance and diagnosis of the presence of WNV in horses from the states of Nuevo Leon, and Coahuila and the results were: from a total of 498 sample horses screening, 23.29% were positive for WNV by blocking ELISA test. Objective 3.- Surveillance and diagnosis for the presence of WNV in mosquitoes from the states of Nuevo Leon. Were collected a total of 2,297 mosquitoes and after of the screening it was found .047% of infection and it was made an isolation of the virus. WNV it is present in the states of Northeast of Mexico, also the resident birds collected had the major frequency of positives, and indicate that the mosquitoes of this region were infected when they took blood from migratory birds and in the same time they infected to resident birds and local horses.

## 2. INTRODUCCION GENERAL

El Virus del Oeste del Nilo (WNV) el cual fue llamado así por Smithburn, Hughes, Burke, y Paúl en 1940 es un miembro de la Familia Flaviviridae (género Flavivirus) (Jonson 2001), fue aislado por primera vez en 1937 de sangre periférica de una mujer en el Distrito West Nile en Uganda, África, (Work 1955; Lanciotti 2001). Su ciclo natural incluye la participación de aves silvestres y domésticas, migratorias y residentes; quienes tienen el papel de reservorios y amplifican las poblaciones virales; mosquitos ornitofílicos principalmente del género *Culex* se alimentan de estas aves durante su tiempo de tiempo de sueño; infectándose y siendo capaces 10-12 días después de transmitir WNV por picaduras infectantes, tanto a seres humanos como a equinos y otras aves cercanas (Figura 1).

### Virus West Nile: Ciclo de Transmisión en América del Norte

#### Ciclo enzoótico (Mantenimiento/Amplificación)

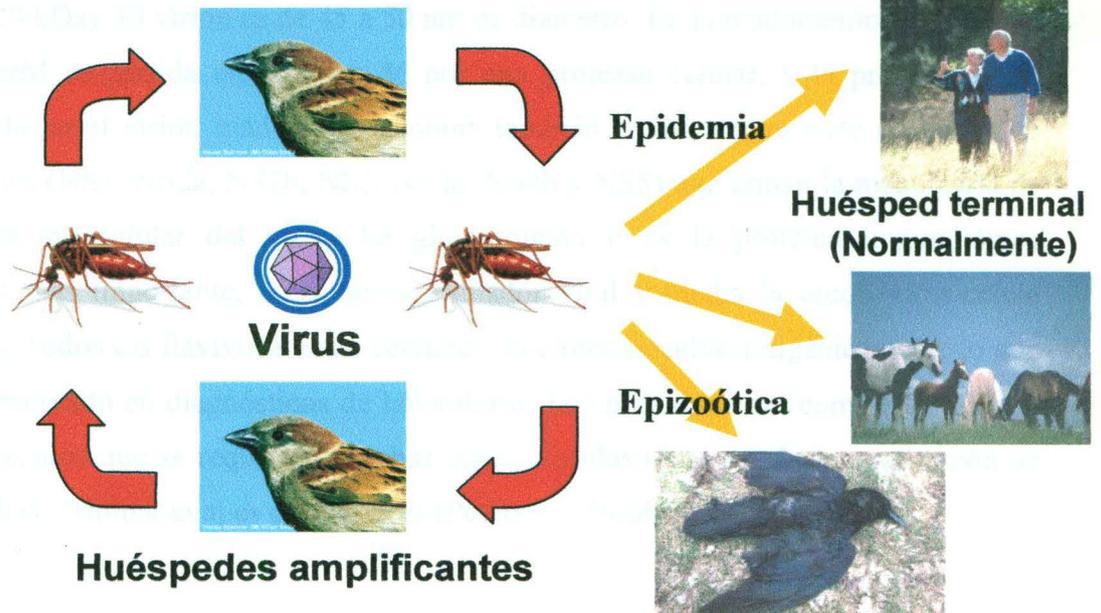


Figura 1. Ciclo de transmisión del Virus del Oeste del Nilo.

## **2.1 Sintomatología**

Los síntomas de la enfermedad en seres humanos fueron analizados en la epidemia de Nueva York y Nueva Jersey en 1999. De 90 pacientes internados con infección comprobada de WNV, 11 mostraron encefalitis o meningoencefalitis; y solo ocho tuvieron meningitis. La edad de los pacientes exhibió un rango de 37-87 años, y una mediana de 63 años. Fiebre y síntomas neurológicos y gastrointestinales predominaron. Debilidad severa muscular en la examinación neurológica se encontró en tres pacientes. La edad fue asociada con la severidad de la enfermedad. La tasa de fatalidad de 5-14% se mantuvo igual en 1999 y 2000.

## **2.2 Estructura del WNV**

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

TABLA I

Distribución del serocomplejo del Virus de la Encefalitis Japonesa.

<b>Virus</b>	<b>Abreviación</b>	<b>Distribución Geográfica</b>
Cacipacore	CPC	América del Sur
Koutango	KOU	África
Encefalitis Japonesa	JE	Asia, Oceanía, Australia
Encefalitis del Valle de Murray	MVE	Australia
Alfuy	ALF	Australia
Encefalitis de San Luis	SLE	América del Norte y Sur
<b>Encefalitis del Oeste del Nilo</b>	<b>WNV</b>	<b>África, Asia, Europa, América del Norte</b>
Kunjin	KUN	Australia
Yaounde	YAO	África

### 2.3 Métodos de Diagnóstico

Considerando su relación filogenética con el grupo anterior de arbovirus y su sorprendente llegada a América; los métodos de diagnóstico del Virus del Oeste del Nilo tomaron desprevenidos a los virólogos. Consecuentemente, los métodos para su diagnóstico en laboratorio en los Estados Unidos, se han centrado en sus inicios en pruebas simples extrayendo antígeno viral de cultivos celulares aislados de cerebros de cuervos y/o caballos (White *et al.* 2001). Estos ensayos han sido pruebas de Inhibición de la Hemoaglutinación, prueba de neutralización de reducción de placa, y aislamiento en cultivo de células Vero. Todos estos ensayos comprenden las herramientas para la detección del virus en sueros y tejidos de muestras humanas y aves vivas y aquellas que eran colectadas muertas. Claramente, la urgencia de pruebas suficientemente sensibles y específicas ha sido una necesidad en la actual epidemia del Virus del Oeste del Nilo en Norte América; pues las escasas pruebas comerciales como el PANBIO de una empresa

Australiana, corría el conocido riesgo de presentar fallas dadas las frecuentes mutaciones del genoma del virus, y la cercanía de virus en Australia con el serocomplejo de la Encefalitis Japonesa. Los avances mas recientes en diagnóstico serológico en Estados Unidos incluyen una prueba bloqueadora de ELISA o enzima ligada a un sustrato, en desarrollo y validación de campo actualmente por el grupo de la Universidad de Colorado, USA; así como una prueba molecular por RT-PCR o Trascrición Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Beaty *et al.*,2002). Se han utilizado exitosamente una prueba de RT-PCR con primers dirigidos al genoma del Virus en grupos de mosquitos de Nueva York (White *et al.* 2001). En México, a la fecha, no hay establecida por los Sistemas de Salud, INDRE o Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica, ninguna prueba diagnóstica de laboratorio, planteando un problema muy serio para los incipientes programas de vigilancia de esta arbovirosis en México.

## **2.4 Epidemiología**

El reconocimiento del Virus del Oeste del Nilo (WNV) en la ciudad de Nueva York en el verano de 1999, marcó la primera introducción en la historia reciente de la llegada de un flavivirus del Viejo al Nuevo Mundo (Asnis *et al.* 1999; Nash *et al.* 1999). Sin embargo, este patógeno no es un hecho aislado, el fenómeno de la globalización comercial e incremento en viajes inter e intracontinentales ha favorecido la dispersión de otros flavivirus, por ejemplo el virus del Dengue quien se ha dispersado desde Asia hasta llegar a regiones tropicales del continente Americano (Gluber, 1987; Gluber y Clark, 1995; Gluber, 1998; Petersen y Roehrig 2001).

Desde su aislamiento original en 1937, han ocurrido brotes de manera esporádica en humanos, siendo los más notables las epidemias de Israel en 1951-54, 1957), y en Sudáfrica en 1974. Sin embargo, a partir de la mitad e los 90as tres perturbantes tendencias epidemiológicas han ocurrido: a) incrementos en frecuencia de brotes con casos humanos y equinos (Rumania 1996, Marruecos 1996, Túnez 1997, Italia 1998, Rusia, Estados Unidos e Israel 1999), e Israel, Francia y los Estados Unidos en 1999 (19-23), b) Un incremento aparente en severidad de la enfermedad humana; Rumania

393 casos, Rusia 942 casos, Estados Unidos 62 casos en 1999 y 21 en 2000, Israel 2 casos en 1999 y 417 casos en 2000) alta mortalidad en aves acompañando las epidemias en humanos, Israel y Estados Unidos.

## 2.5 El papel de las aves

Por otra parte, más de 100 especies de aves han sido reportadas con anticuerpos neutralizantes al Virus del Oeste del Nilo, en los Estados Unidos. Estas tienen un papel muy importante en el mantenimiento del virus en la naturaleza pues actúan como reservorios, amplificando y dispersando el virus a través de sus ciclos anuales de migración. Más de siete Ordenes de aves probaron seropositividad a WNV, siendo los de mayor importancia Passeriformes, Columbiformes, Galliformes y Anseriformes (Komar *et al.* 2001). De manera interesante, los casos humanos en Nueva York en Agosto y Septiembre de 1999, estuvieron precedidos de los ciclos de migración primaveral y de principios del otoño. El fenómeno de mortalidad de aves principalmente cuervos, azulejos y gorriones domésticos apareció por primera vez en América, indicando un potencial cambio en el genoma de virus o una alta susceptibilidad de estas especies en Norte América a la viremia. Después de la experiencia de Nueva York, y los casos de la enfermedad en 2002 en Luisiana, Atlanta, Texas y Illinois, la mortalidad de Corvidae ha sido sugerida como un método altamente confiable de vigilancia epidemiológica. Otros reportes de vertebrados infectados con Virus del Oeste del Nilo en Nueva York han sido la zarigüeya *Didelphys marsupialis*, murciélagos, ardillas y otros, aunque en menor cantidad, y por lo tanto su papel en el mantenimiento de esta zoonosis no ha sido aún evaluado.

## 2.6 Mosquitos vectores involucrados

En cuanto a las especies de mosquitos involucradas como vectores probados del Virus del Oeste del Nilo, más de 35 especies han sido encontradas infectadas con WNV. Los géneros más frecuentes de Culicidae registrados en la epidemia de Nueva York fueron: *Aedes*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Culiseta*, *Psorophora*, y el grueso de ellos correspondió a *Culex*, el mosquito café de las casas, además de *Culex restuans* y *Culex*

*sallinarius*. *Aedes trivittatus* y *Ae. vexans*, ambas especies de charcas de lluvia y lagunas urbanas fueron además muy abundantes en Nueva York; pero notablemente las especies de *Culex*, *pipiens* y *quinquefasciatus* donde más frecuentemente se aislaron Virus del Oeste del Nilo a través de la prueba de cultivo en placas de células Vero (Nasci *et al.* 2001). Estas dos especies son muy abundantes también en el Noreste de México; y sus sitios de oviposición tienen que ver con cuerpos de agua con elevada cantidad de materia orgánica, en otras palabras, agua pestilente, lo cual se puede localizar en arroyos urbanos con aguas estancadas; tuberías de drenaje pluvial, recipientes peridomésticos en patios como llantas abandonadas y bebedores de animales. Esto plantea un problema de control para los programas del sector salud, no acostumbrados a aplicar medidas de control en estos criaderos, pues los últimos 20 años ellos se han concentrado en el mosquito del dengue, *Aedes aegypti*, quien a diferencia de *Culex*, prefiere para ovipositar pequeños recipientes domésticos con agua limpia y bajo sombra (Fernández 1999).

Un dato importante, es que la transmisión transovárica o vertical del Virus del Oeste del Nilo por hembras de *Culex* ya ha sido demostrado en África (Miller *et al.* 2000). Esto explicó la persistencia de la epidemia en Nueva York, en el año 2000; pero principalmente que el virus demostró su capacidad para pasar el invierno, en los mosquitos hibernantes en alcantarillas y otros sitios protegidos del frío.

## **2.7 Epizootias en equinos**

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

De enero del 2000 a enero del 2001, aproximadamente 360 muestras de equinos fueron enviadas al Servicio de Inspección de Sanidad Vegetal y Animal, del Laboratorio Ames perteneciente al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Las muestras provenían de los Estados del Norte, y correspondían a suero, líquido cefalorraquídeo o cerebro. Sesenta caballos fueron positivos para Virus del Oeste del

Nilo en las muestras del 2000, 38% de ellos murieron o se les aplicó eutanasia; los síntomas en los demás incluyeron debilidad en las extremidades, ataxia, fiebre, parálisis facial, tirones, y ceguera. Epidemias de Virus del Oeste del Nilo en equinos han sido confirmadas además en Francia en el 2001 (Durand *et al.* 2002). Durante el 2002, fueron registrados 7,320 equinos, tres caninos y otras 10 especies (CDC 2002).

De manera importante, los equinos parecen presentar mayor sensibilidad al Virus, pues según reportes del Centro para Prevención y Control de Enfermedades de Atlanta, en el estado de Texas, la distribución de equinos infectados sobrepasa de manera muy evidente la de aves, mosquitos y casos humanos.

## **2.8 Amenaza a la salud pública por el riesgo inminente de introducción del Virus del Nilo en Nuevo León**

En México, particularmente en los Estados del Noreste cercanos a la frontera con los Estados Unidos (Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila), el verano del 2002 disparó un estado de alarma epidemiológica en los Sistemas de Salud por los reportes de casos humanos y defunciones, equinos infectados, aves silvestres y especies de mosquitos vectores positivos al Virus del Oeste del Nilo, en los estados cercanos de Texas y Louisiana. Las cifras más recientes emitidas por el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades de Estados Unidos, hasta el 21 de Octubre del 2002 confirman los siguientes datos de la dispersión del Virus del Nilo: 3,231 casos en 38 Estados, incluyendo el Distrito de Columbia; la mayoría Estados de la Costa del Atlántico; una Tasa de Mortalidad de 5.5% o sea 176 defunciones. Los Estados vecinos y cercanos con México han registrado los siguientes casos y defunciones: Texas, 137 casos con seis defunciones, Louisiana, 310 casos con 16 defunciones; Alabama, 39 casos y tres defunciones y Mississippi con 178 casos y 9 decesos.

Las fuertes sospechas de aves infectadas en la región fronteriza de los Municipios de Matamoros y Valle Hermoso, en el Norte de Tamaulipas, han aumentado por el reporte en Septiembre del Departamento de Salud de Texas de dos equinos positivos a WNV en las inmediaciones de Harlingen y Brownsville, Texas; ambas

ciudades localizadas a menos de 10 kilómetros de la frontera con las ciudades tamaulipecas mencionadas. Similarmente, 206 aves muertas encontradas en el área Metropolitana de Monterrey por personal de la Secretaría de Salud, en el Estado de Nuevo León, han sido todas negativas por la prueba de RT-PCR. Sin embargo, como se documentó en la epidemia de Nueva York, las epidemias de Virus del Oeste del Nilo en humanos siempre fueron asociadas con patrones de migración de las especies de aves involucradas. No sería extraño por consiguiente, que la entrada del otoño en Septiembre del 2002 favoreciera la presencia de las primeras aves infectadas en el Noreste de México; y esto sólo se interpretaría como cuestión de tiempo para esperar en la primavera y otoño del 2003, la primera epidemia humana de Virus del Nilo en México.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y ORIGINALIDAD

Las epidemias en USA de la Encefalitis del Oeste del Nilo en el Verano del 2002, mostraron un patrón de dispersión geográfica hacia la frontera Sur, específicamente Texas y Luisiana. Aproximadamente 3,200 casos humanos fueron reportados en el ese año mostrando una tasa de fatalidad de 5.5%. Considerando que el ciclo natural de la transmisión de esta enfermedad involucra aves migratorias que pasan por nuestro Estado en su camino hacia Centro y Sudamérica, también que las especies de mosquitos presentes en el Noreste de México son vectores probados del Virus del Oeste del Nilo y que sus poblaciones fueron incrementadas por un año de precipitaciones históricas; es casi inminente la presencia de epidemias en Nuevo León para el Verano del 2003. Lamentablemente, las técnicas de diagnóstico tanto para muestras humanas como para aves y equinos que también son afectados, son sólo comerciales, escasas, costosas, de dudosa sensibilidad y especificidad. La situación de un efectivo sistema de monitoreo epidemiológico que apoye la oportuna prevención y dirija las medidas de control hacia los vectores, exhibe todavía muchas interrogantes por la falta de experiencia en el conocimiento de la epidemiología y ecología de esta arbovirosis.

Este proyecto propone el desarrollo de tecnologías de métodos de diagnóstico serológicos y moleculares para la identificación del Virus del Oeste del Nilo en aves, equinos y mosquitos, así como el establecimiento de un programa de monitoreo epidemiológico.

Entonces, considerando la dispersión geográfica de las epidemias del Virus del Nilo hacia el Sureste de los Estados Unidos en el año 2002; y como consecuencia la inevitable amenaza de su entrada al Estado de Nuevo León para fines de este año, y muy segura ocurrencia de brotes en el 2003; con consecuencias en indicadores de salud de la población e impacto en la economía regional; aunado a la escasez de pruebas

diagnósticas tanto las comerciales de bajo costo como la falta de disponibilidad de las mismas por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica de la Secretaría de Salud; ésta propuesta justifica ampliamente la urgente necesidad de desarrollar localmente y en corto plazo la capacidad diagnóstica de pruebas de laboratorio sensibles y específicas para identificar el Virus del Oeste del Nilo tanto en aves, como en las especies de mosquitos además de huéspedes susceptibles tales como equinos que conforman su ciclo de transmisión.

#### 4. LITERATURA CITADA

- Asnis DS, Conetta R, Teixeira AA, Waldman G, Sampson BA. The West Nile Virus outbreak of 1999 in New York: the Flushing Hospital experience. *Clin Infect Dis* 2000; 30:413-8.
- Centres for Disease Control and revention. 2002 West Nile Activity-United States, 2001 NNWR Mortal Wkly Rep;51:497-501
- Durand, B. Chevalier V, Poullot R, Lable J, Marendat I, Murgue B, Zeller H, and Zientrara S. 2002. West Nile Virus outbreak in horses, Southern France, 2000: results of a serosurvey. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 777-782
- Fernández S., I. 1999. *Biología y Control de Aedes aegypti*. Manual de Operaciones. Editorial Universidad Autónoma de Nuevo León., México
- Gubler DJ, Clark G.G.. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. *P R Health Sci J* 1995; 6:107-11.
- Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore* 1998;27:227-34.
- Johnson DJ, Ostlund EN, Pedersen DD, Schmitt BJ. Detection of North American West Nile Virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Emerg Infect Dis* 2001;7.
- Komar, N, Panella NA, Burns JE, Dusza SW, Mascareñas TM, and Talbot TO. 2001. Serologic evidence for West Nile infection in birds in the New York city vicinity during an outbreak in 1999. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 621-625
- Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, *et al.* Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:4066-71.
- Miller BR, Nasci RS, Godsey MS, Savage HM, Lutwama JJ, Lanciotti RS, *et al.* First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:240-6.

- Nasci RS, Savage HM, White DF, Miller JR, Cropp BC, Godsey MS, *et al.* West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001;7.
- Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, *et al.* Outbreak of West Nile virus infection, New York City area, 1999. *N Engl J Med* 2001;344:1807-14.
- Oustland, E.N., Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Oliver Williams W, and Schmitt BJ. Equine West Nile Encephalitis, United States. 1999. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 665-669
- Petersen LR, Roehring JT. West Nile virus: areemerging global pathogen. *Emerg Infec Dis* 2001;7(4);611-614.
- White, D J, Kramer LD, Backenson PB, Luckacik G, Johnson G, Oliver J, Howard JJ, Means G, Eidson M, Gotham I, Kulasekera V, Campbell S, the Arbovirus Research Laboratory, and the Statewide West Nile Response Teams. 2001. Mosquito Surveillance and Polymerase Chain Reaction detection of West Nile Virus, New York State. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 643-649
- Work, T.H., Hurlbut, H.S, Taylor, R.M. 1955. Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am J Trop Med Hyg.*;4(5):872-88.

## CAPITULO I

El presente trabajo se realizó en el marco de un convenio de colaboración entre el Centro de Estudios Científicos de Valdivia y el Instituto de Medicina Veterinaria de la Universidad Austral de Chile. El autor agradece a los señores Dr. Carlos Valdovinos y Dr. Daniel Florentino por haber permitido el acceso a los sistemas de información de la Universidad Austral de Chile. En particular, agradece a los señores Dr. Carlos Valdovinos y Dr. Daniel Florentino por haber permitido el acceso a los sistemas de información de la Universidad Austral de Chile. En particular, agradece a los señores Dr. Carlos Valdovinos y Dr. Daniel Florentino por haber permitido el acceso a los sistemas de información de la Universidad Austral de Chile.

## CAPITULO II

### DETECCION DE WNV EN AVES Y CABALLOS

El presente capítulo describe los resultados obtenidos en la detección de WNV en aves y caballos. Se realizaron análisis de sangre y suero de 100 aves y 50 caballos en la zona de estudio. Los resultados indican la presencia de WNV en 15% de las aves y 5% de los caballos. Estos resultados sugieren la presencia de WNV en la zona de estudio.

## 1. RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo con el fin de monitorear la actividad del Virus del Oeste del Nilo (WNV) aves y equinos de los estados del Noreste de México (Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila); esta fiebre es una enfermedad causada por el Virus de la familia Flaviviridae, genero Flavivirus, además pertenece al serocomplejo de la Encefalitis Japonesa (EJ). Las primeras aves infectadas por el WNV en el hemisferio occidental se identificaron en agosto de 1999 en New York, en el presente estudio se colectaron aves pertenecientes a 13 órdenes 38 familias, 86 géneros y 123 especies por medio de redes de niebla; de los ordenes con mayor numero de ejemplares fueron Passeriformes con 1248 ejemplares y Columbiformes con 282. La prueba para la determinación del WNV fue la ELISA de bloqueo. De las 1,686 aves colectadas, 90 resultaron seropositivas al WNV, 43 en Nuevo León 39 en Tamaulipas, y 8 para el estado de Coahuila. Así mismo, se llevaron a cabo un total de 39 colectas de suero de equinos en los estados de Nuevo León y Coahuila, muestreándose un total de 498 caballos (474, 95.18%) para Nuevo León, y 24 (4.81%) para Coahuila, de los cuales 116 (23.29%) resultaron seropositivos, 100 en Nuevo León y 16 en el estado de Coahuila, lo que nos lleva a la conclusión que el WNV ya estableció un ciclo enzoótico en el Noreste de México.

## 2. INTRODUCCION

El Virus del Oeste del Nilo (WNV) ha emergido como una importante amenaza a la salud a nivel humano, veterinario y de vida silvestre. Las aves hospederos, son el principal reservorio vertebrado en el mantenimiento de este virus (Komar 2003); tiene cierto grado de mortalidad entre equinos, así como en aves domésticas y silvestres. La manifestación más grave del WNV es la encefalitis que es la evolución fatal en el hombre y el caballo, así como la mortandad de ciertas especies de aves salvajes y domésticas. (Valles 2000). La primera epidemia registrada del Virus del Oeste del Nilo (WNV) ocurrió en el área metropolitana de Nueva York en el verano de 1999. Se notificaron un total de 62 casos humanos con síntomas neurológicos y 7 defunciones en esta ciudad (Rappole *et al.* 2000; Lanciotti *et al.* 1999).

Además de las epidemias humanas, surgieron también epizootias en caballos y aves, donde las aves infectadas con WNV en el Hemisferio Occidental ocurrieron en agosto de 1999. Esta epidemia tuvo un alta tasa de mortalidad en aves, específicamente *Corvus brachyrhynchos* además de otros córvidos (Steele *et al.* 2000; Eidson *et al.* 2001). Así mismo grandes cantidades de aves en cautiverio y silvestres murieron, esto coincidiendo con el incremento de casos humanos reportados en la misma región (Steele *et al.* 2000).

Se sospecha que las aves migratorias son los principales huéspedes introductorios del virus, pues los brotes en las regiones templadas ocurren en general durante el fin del verano y principios del otoño, coincidiendo con la llegada de grandes grupos de aves migratorias. Los brotes a menudo ocurren entre los seres humanos que habitan cerca de zonas pantanosas, donde se establece contacto entre concentraciones de aves con gran número de mosquitos, que a su vez son capaces de infectar a los humanos (Rappole *et al.* 2000). Además de las aves migratorias, los viajes internacionales de personas

infectadas hacia Nueva York y la importación de aves o de mosquitos son otras posibles fuentes de introducción del virus del WNV a Norteamérica (CDC 2000). Se ha sugerido también, que las aves predatoras pueden haberse infectado al alimentarse a su vez de presas infectadas (otras aves, ranas y pequeños mamíferos), (Environmental Risk Analysis Program 2002).

Un total de 194 muertes de aves silvestres a causa del WNV fue reportado en el otoño de 1999 (Swayne *et al.* 2001). La mayoría de las aves muertas fueron del orden Passeriformes (>80% córvidos). Durante ese mismo año, fueron reportados 25 casos de enfermedad neurológica en caballos en Nueva York (Komar 2000).

### 3. HIPOTESIS

Debido a la presencia del mosquito vector *Culex quinquefasciatus* en el Noreste de México y su capacidad para la transmisión del VON, hacen posible la presencia de anticuerpos neutralizantes tanto en aves residentes y migratorias como equinos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general:**

Monitorear y diagnosticar el Virus del Oeste del Nilo en los estados del Noreste de México.

### **4.1.2 Objetivos específicos**

- 1.- Monitorear y diagnosticar la presencia del Virus del Oeste del Nilo, en aves de los estados Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas.
- 2.- Monitorear y diagnosticar la presencia del Virus del Oeste del Nilo, en equinos de los estados Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Epidemias Históricas del WNV

No se sabe si históricamente el WNV ha producido enfermedades en aves, sin embargo no hay reportes de WNV asociado con mortalidad en adultos de aves que hallan ocurrido durante las primeras seis décadas después del descubrimiento del virus en 1937. De manera importante, una de las cadenas de WNV de Egipto (Ar-248), fue aislado de una ave enferma (*Columba livia*) en un estudio que se llevo acabo de 1952 a 1954 (Tylor 1956).

En 1953, se enfoco la atención a la posibilidad de que las aves silvestres de las áreas endémicas al WNV en el Delta del Nilo pudieran proveer de una fuente suficiente de no inmunidad durante la época de anidación de primavera, para circular WNV con títulos suficientemente altos y con tiempo suficiente para infectar a los mosquitos vectores durante la época de transmisión de verano (Work 1955).

El WNV ha circulado durante mucho tiempo en diferentes partes del mundo, principalmente en África, Asia, sur de Europa y Australia, siendo el responsable de grandes epidemias, como las ocurridas en Israel en los años 1950's, Francia (1962), Sudáfrica (1974) Rumania (1996) y Belgrado, Rusia (1999), (Rappole *et al.* 2000; Lanciotti *et al.* 1999).

Las epidemias causadas por el WNV y el de la encefalitis de San Luis han sido difíciles de predecir, en parte debido a la falta de conocimiento de la compleja ecología de los virus. Se considera que veranos cálidos y secos pueden promover epidemias causadas por ambos virus (Tsai *et al.* 1998; Platonov *et al.* 1999; Han *et al.* 1999; Reiter, 1999).

## 5.2 Ecología del virus

Poco es conocido acerca de la persistencia del virus activo en la sangre de las especies de aves de este continente. Se piensa que el rol de las aves en la ecología de los arbovirus depende de si el vector al migrar encuentra las condiciones favorables en el nuevo ambiente, y también si los vectores locales son capaces de transmitir el virus. La presencia de anticuerpos de arbovirus en aves migratorias solo representa una interacción virus-hospedero pero no explica cuando y en donde ocurrirá la infección (Blaskovic y Ernek 1972).

En un estudio hecho en el centro de control y prevención de enfermedades en USA (CDC) para determinar si hay diferencias fenotípicas entre diferentes aislamientos de WNV, se expusieron House sparrows (*Passer domesticus*) a tres líneas de este virus: WNV-NY 99, Kenia (KEN), y Australia (KUN); todas estas aves (excepto los controles) desarrollaron viremias detectables realmente parecidas para las tres cadenas del virus, pero sólo tres infecciones fatales ocurrieron en ocho de las aves inoculadas con NY-99, 4 con KEN, y cero con KUN, estas muertes ocurrieron entre los cinco y ocho días postinoculación y todas las mortalidades sucedieron entre los revisiones rutinarias, lo que indica que ya que estas aves son abundantes en América del Norte, regiones de Europa, África, y Asia, ellos son probablemente importantes hospederos amplificadores en muchas de estas regiones, y por lo tanto sirven como un útil modelo de estudio de infecciones para el WNV en aves (Langevin *et al.* 2005). En otro estudio para entender mejor el papel de las aves en la transmisión del virus, se expusieron 25 especies de aves, representando un amplio rango de órdenes y familias, a la infección por picadura de mosquitos. Se monitorearon títulos de viremia, en cavidades cloacales y orales, persistencia de infecciones virales en órganos, y desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Los datos generados se utilizaron para cuantificar la competencia entre reservorios. Además se evaluaron la susceptibilidad a transmisión oral y por contacto (Komar 2003).

Si la transmisión transovárica y la supervivencia al invierno de los mosquitos fue la principal causa de la persistencia del virus, se esperaría una recurrencia anual del virus

en los mismos sitios. Sin embargo, la transmisión transovárica del virus ocurre a niveles bajos de menos del 1% (Peiris 1994; Baqar *et al.* 1993) por lo tanto, la única forma en que puede pasar de una generación a otra de mosquitos es a través de la sangre de una ave u otro hospedero.

### 5.3 Monitoreo en Aves

El WNV es mantenido en la naturaleza por medio de aves (Komar 2000), históricamente, la manera más efectiva de predecir la actividad de flavivirus ha sido los programas de vigilancia en las poblaciones de aves centinelas o silvestres por medio de una toma de muestra de sangre, además de las colectas de mosquitos vectores para obtener numero y tasa de infección (Bowen *et al.* 1980; Monath 1984). En un estudio en los 50's se tomaron muestras sanguíneas de diversas aves silvestres del delta del Nilo para pruebas serológicas por medio de punción cardiaca con jeringas de 2 a 10cc, para posteriormente esta sangre ser centrifugada y solo se conservaron los sobrenadantes; de 120 aves colectadas (35 gorriones caseros (*Passer domesticus*), 17 cuervos encapuchados (*Corvus corone*), 33 palomas de la palma senegalense (*Streptopelia senegalensis*), 28 Garcillas bueyeras (*Ardeola ibis*), 6 Cernícalos americanos (*Falco sparverius*), y 1 milano azul (*Elanus caeruleus*) se obtuvieron porcentajes muy altos de positividad (57%, 88%, 48%, 68%, 100%, y 100% respectivamente) (Work *et al.* 1955).

El monitoreo de la infección de WNV en aves, especialmente cuervos, fue el método más eficaz para determinar el rango geográfico de la actividad del WNV en el brote de Norte América (Komar 2000). La alta tasa de mortalidad observada en 8 de 25 especies utilizadas en el estudio realizado por Komar *et al.* (2003), indica que esas 8 especies pueden ser utilizadas para un Sistema de Vigilancia de aves muertas. Entre estas especies se incluyen todos los córvidos que se utilizaron, así como *Passer domesticus* y *Quiscalus quiscula*, dos abundantes especies que parecen ser importantes huéspedes reservorios en algunos sitios, y la gaviota *Larus delawarensis*. Más de 100 especies de aves han sido reportadas con anticuerpos neutralizantes al Virus del Oeste del Nilo, en los Estados Unidos. Estas tienen un papel muy importante en el mantenimiento del virus en la naturaleza pues actúan como reservorios, amplificando y

dispersando el virus a través de sus ciclos anuales de migración. Más de siete Ordenes de aves probaron seropositividad a WNV, siendo los de mayor importancia Passeriformes, Columbiformes, Galliformes y Anseriformes (Komar *et al.* 2001).

La cadena de WNV de Norte América fue primeramente identificada de el cerebro de un cuervo americano muerto (*Corvus brachyrhynchos*) colectado en septiembre de 1999, en New York. Subsecuentemente muchos otros aislamientos fueron hechos de otros cuervos y aves exóticas del zoológico de esta ciudad, las cuales incluyeron Flamingo chileno (*Phoenicopterus chilensis*), Guanay Cormoran (*Phalacrocorax bougainvillei*), águilas calvas (*Haliaeetus leucocephalus*), Magpies de pico negro (*Pica hudsonia*), Pato alas de bronce (*Anas specularis*), Faisanes de Impeyan (*Lophophorus impeyanus*), trogopan de vientre gris (*Tragopan blythii*), y Búhos nevados (*Nyctea scandiaca*) (CDC 1999; Steele 2000). Estos cadáveres fueron usados como centinelas de salud pública. (Eidson, 2001). Otros tipos de aves centinelas usados son típicamente gallinas puestas en jaulas que permitan la entrada y salida de mosquitos y que al mismo tiempo brinden protección de depredadores naturales. Los centinelas de rango libre son las aves silvestres que son capturadas y a las cuales se les toma una muestra de sangre y posteriormente son liberadas (Moore 1993).

En un estudio realizado en el estado de Illinois durante el 2002, se capturaron 1784 aves, representando 10 órdenes, 10 familias y 81 especies donde la familia con mayor abundancia fue Cardinalidae. Anticuerpos para WNV fueron detectados en 94 de estos sueros de aves, representando 5 ordenes (Anseriformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, y Strigiformes) y 19 especies, en donde las especies con más alta seropositividad fueron, paloma doméstica (*Columba livia*), buhos carnudos (*Bubo virginianus*), perdices griegas (*Alectoris graeca*), cardenales rojos (*Cardinalis cardinalis*), gorrión casero (*Passer domesticus*) y cuitlacoques rojizos (*Toxostoma rufum*); las aves cautivas y urbanas tuvieron mayor seropositividad que las aves de áreas naturales y la seropositividad en aves del norte y del centro de este estado fue mayor que las de los sitios del sur (Ringia *et al.* 2002).

En el estado de Yucatán, México, se implementó un programa de vigilancia del WNV, se capturaron un total de 8661 aves silvestres pertenecientes a 182 especies, 28 familias y 14 órdenes, cada ave capturada fue sangrada de la yugular y la sangre diluida en suero salino de fosfatos para su transporte y mantenimiento. Los órdenes con mayor frecuencia de captura fueron, Passeriformes con 7270 (84.34%), Columbiformes con 907 (10.53) y Piciformes con 165 (1.92%). Del total de aves capturadas, 5566 (59%) fueron aves residentes y 3545 (41%) fueron migratorias. Los sueros de estas aves fueron procesados por la técnica de ensayo inmunoabsorbente de enzimas ligadas (ELISA) o es la modalidad de bloqueo o por el método de HI en busca de anticuerpos neutralizantes al WNV, y comprobados por la reducción de la neutralización de placa (PRNT); 21 (0.24%) de las aves presento evidencia de anticuerpos neutralizantes al flavivirus, las aves positivas pertenecieron a 15 especies 11 familias y dos órdenes. Especies con más de una ave seropositiva fueron colorin azul (*Passerina cyanea*) con cinco ejemplares, dos papamoscas tiranos (*Myiarchus tyrannulus*), y dos picogordos pecho rosa (*Pheucticus ludovicianus*) (Farfán *et al.* 2004).

Del 2003 al 2004 en Dakota del Norte se hizo un estudio diseñado para explorar el papel que pueden jugar los mirlo de alas rojas (*Agelaius phoeniceus*) para diseminar el WNV. Se seleccionó a esta especie como modelo por su abundancia, amplia distribución a través de los Estados Unidos, y por la ecología que incluye factores de riesgo conocidos en el mantenimiento y amplificación del WNV. En el primer año colectaron sangre de 301 aves y 362 en el 2004; las muestras fueron tamizadas mediante la prueba de ELISA en busca de anticuerpos neutralizantes, en donde encontraron para el primer año una seroprevalencia de anticuerpos IgG de 2.8% (n= 71) en mayo, y un pico en agosto de 22.0% (n= 41). En el 2004 la prevalencia de anticuerpos fue de 3.9% (n =76) en mayo con un pico en julio de 18.3% (n= 142) (Sullivan *et al.* 2006).

#### **5.4 Migración de aves y dispersión del virus**

Desde el descubrimiento del WNV, nuevos virus inmunológicamente relacionados, han sido aislados en distintas regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo (Work 1955). Aves migratorias han sido consideradas como los principales

hospederos introductores del WNV a nuevas áreas debido a grandes epidemias de esta enfermedad en regiones templadas que generalmente han ocurrido al final del verano o principios de otoño, coincidiendo con el arribo de grandes concentraciones de aves migratorias y mosquitos (Taylor *et al.* 1956; Work *et al.* 1955); estas epidemias con frecuencia ocurren en asentamientos humanos en o cerca de zonas húmedas donde grandes comunidades de aves entran en contacto con grandes cantidades de mosquitos ornitofílicos (Hubálek y Halouzka 1999; Lanciotti *et al.* 1999). Las aves migratorias han sido ligadas al transporte de virus relacionados en el Hemisferio Occidental (Calisher, 1970; Reeves *et al.* 1974); la viremia suficientemente larga como para infectar mosquitos vectores ha sido documentada en varias especies de aves (Taylor *et al.* 1956; Work *et al.* 1955).

Aves migratorias pueden ser las responsables de la dispersión del WNV a nuevas áreas; fue aislado de varias aves migratorias como curruca de barras (*Sylvia nisoria*) y una paloma tortuga (*Streptopelia turtur*). También se supone que las aves migratorias son responsables por la introducción de la encefalitis equina del Este dentro de Jamaica proveniente de los Estados Unidos durante la epidemia de esta enfermedad en 1962 (Rappole *et al.* 2000)

En el brote del WNV en New York en 1999 se piensa que este virus fue introducido por medio de aves migratorias que cruzan de un continente a otro, ya que un pequeño porcentaje de las poblaciones de algunas especies de aves migran regularmente en agosto y septiembre, de sus áreas de reproducción en Europa, a áreas de hibernación a lo largo de la Costa Este de Norteamérica. Un ejemplo es el del pato silbón (*Anas penelope*), que se reproduce en la región Paleártica, desde Islandia hasta la península Ibérica de Kamchatka, e inverna principalmente en las zonas templadas y tropicales del viejo mundo (Rappole *et al.* 2000). Otra de las formas posibles es por medio de tormentas tropicales que cada verano arrastran a unas pocas especies de aves marinas, de sus áreas naturales de la costa oeste de África a través del Atlántico llegando eventualmente a la costa este de Norte América. Algunas de estas especies las cuales se les ha detectado el WNV son: *Ardea cinerea* (garza real), *Egretta garzetta* (garceta pequeña), *Bubulcus ibis* (garza ganadera), *Larus ridibundus* (gaviota encapuchada),

*Larus cachinnans* (Gaviota patamarilla). No obstante a esta hipótesis, se debe tomar en cuenta que si la migración normal fuera la única causa de la introducción de este virus al nuevo mundo, probablemente estaría establecido desde mucho tiempo atrás en este hemisferio; además el número de aves migrantes es tan insignificante que la probabilidad de migrantes infectados, mosquitos ornitofílicos, y aves hospederas locales que amplificaran el virus es muy baja (Lanciotti *et al.* 1999)

Otra de las hipótesis para, la introducción del WNV pudo haber sido por medio de las importaciones legales e ilegales de aves. A pesar de que al menos las primeras son sometidas a cuarentena de al menos 30 días en sitios localizados cerca de tres puertos de entrada (en New York, Los Ángeles y Miami) y de que se llevan a cabo pruebas para detectar si contienen algunas enfermedades como la enfermedad de Newcastle (40) algunas de estas aves podrían haber estado infectadas con WNV y ser picadas por mosquitos, además no se realizaban pruebas específicas para el WNV durante la cuarentena, y en este mismo plazo las aves infectadas pudieron transmitir el virus a las aves locales. Es más probable pensar que la transmisión ocurrió por la importación ilegal de aves en donde estas no son sujetas a cuarentena y a examinación sanitaria. A pesar de tales consideraciones, otras formas en que este entro a América son posibles. (Hubálek y Halouzka 1999).

Cuando especies migratorias llegan a un área en época de mosquitos, las condiciones son apropiadas para que se de una epidemia (Hubalek y Halouzka 1999; Rappole *et al.* 2000). Por otra parte, el virus puede permanecer latente esperando las condiciones ambientales adecuadas que favorezcan una epidemia (Hannoun *et al.* 1972 en Rappole *et al.* 2000). Esto sugiere que los futuros movimientos del virus en el Hemisferio Occidental pueden depender de su persistente amplificación en poblaciones de aves que invernan en regiones tropicales, subtropicales y templadas del sur; y la subsiguiente importación a áreas de mayor concentración de aves en regiones templadas; esto podría representar también una base permanente y un sitio de amplificación para el virus a través del cual se disperse hacia el norte por aves migratorias (Rappole *et al.* 2000).

Debido a que la mayoría de los reportes de aves muertas corresponden a cuervos, la especie *Corvus brachyrhynchos* ha sido propuesta como la base para el sistema nacional de vigilancia de aves muertas por WNV en Estados Unidos (Eidson *et al.* 2001). A pesar de que los cuervos son comúnmente reportados como infectados por WNV (Bernard *et al.* 2001), la identidad de los reservorios del WNV no es del todo conocida. La vigilancia establecida a partir de aves muertas y estudios de seroprevalencia no indica la competencia de especies particulares para infectar vectores.

La muerte de aves por WNV no fue reportada hasta 1998 cuando se registraron muertes de gansos domésticos y de la especie *Ciconia ciconia* en Israel (Malkinson *et al.* 2002). La cepa encontrada en gansos en 1998 es idéntica a la cepa de Nueva York de 1999 que se presentó en miles de aves muertas, lo cual sugiere la no exposición y la adaptación del virus en poblaciones de aves del continente Americano comparándolas con especies de Europa (Lanciotti *et al.* 1999).

En un estudio longitudinal del WNV en el Estado de Yucatán, México, cinco de de 8611 aves fueron consideradas inequívocamente que habían tenido infección del virus, de las cuales 3 de estas fueron migratorias. La península de Yucatán es uno de los principales sitios de hibernación para muchas especies de aves que migran del Noreste y Oeste medio de los Estados Unidos, con esto se puede suponer que el virus fue introducido por aves migratorias a esta región de México (Farfan *et al.* 2004).

Las especies de aves con altos picos de viremia y duración de la misma generalmente presentan altos valores en los índices de competencia (el índice de competencia indica el número relativo de vectores infecciosos que derivan de ciertas especies de aves y es calculado como una función de la viremia que se desarrolla después de la infección causada por mosquito) (Komar *et al.* 1999). Este estudio concluyo que las aves de los órdenes Passeriformes y Charadriiformes, y por lo menos dos especies de rapaces *Falco sparverius* y *Bubo virginianus* de los órdenes Falconiformes y Strigiformes, son más competentes que las especies pertenecientes a los órdenes: Anseriformes, Columbiformes, Galliformes, Gruiformes, Piciformes y Psittaciformes (Turrel *et al.* 2000).

## 5.5 Rutas Migratorias

Se han identificado cuatro rutas principales de migración que utilizan las aves que se reúnen y pasan a través del área de la ciudad de Nueva York (definido como un círculo de 10 km. de radio que esta centrado en el Norte de Queens) al final del verano y principios de otoño; estas rutas son la ruta al sureste de los Estados Unidos, la que circunda el Golfo de México, la que atraviesa el Golfo de México, y la ruta de las Islas Caribeñas-Noroeste del Atlántico. Por medio de estas rutas las aves llegan a cada parte del sureste de Estados Unidos, Centro América, las islas del Caribe y Sudamérica, durante su migración al sur hacia sus sitios de hibernación; además durante su retorno al norte a los sitios de reproducción pueden llegar casi a cualquier lugar de Norte América (Rappole *et al.* 2000).

### 5.5.1 Ruta del Sureste de Estados Unidos

Los miembros de aproximadamente 155 especies de aves pasan a través del área de Nueva York en su camino a áreas de hibernación en el sureste de Estados Unidos, siguiendo la ruta descrita por W.W. Cooke para el mirlo primavera (*Turdus migratorius*) (Rappole *et al.* 2000). La mayoría de estas especies no son huéspedes susceptibles al virus ya que llevan a cabo individualmente la migración y de esta manera no se juntan grandes cantidades de estas aves en lugares con altas concentraciones de mosquitos ornitofílicos. Sin embargo, aproximadamente 32 especies de aves que siguen esta ruta de migración podrían presentarse en grandes densidades en o cerca de zonas húmedas en su paso por Nueva York o en su camino a sus zonas de hibernación. Como ejemplos de esta ruta de migración están el cuervo americano *Corvus brachyrhynchos* y *Anas platyrhynchos* que es el pato de collar (Rappole *et al.* 2000).

### 5.5.2 Ruta que circunda el Golfo de México

Las aves de algunas especies que típicamente pasan el invierno en México y Centro América evitan cruzar largas extensiones de agua, entre estas especies se incluyen halcones, garzas, garcetas, así como algunos patos y gaviotas. Aunque algunas aves pueden volar directamente a través del Golfo de México a sus sitios de hibernación,

se desvían pasando a lo largo de la costa del Golfo en ambas migraciones, hacia el sur y hacia el norte. Aproximadamente 11 de esas especies se reúnen en zonas húmedas alrededor de Nueva York durante la migración y de nuevo en las áreas de hibernación; un ejemplo es la gaviota plateada *Larus argentatus* (Rappole *et al.* 2000).

### 5.5.3 Ruta que atraviesa el Golfo de México

Aproximadamente 125 especies de aves tienen poblaciones que transitan la región de Nueva York en su camino a sus áreas de hibernación en México y Centro América siguiendo atravesando el Golfo de México en el otoño (Cooke 1915; Rappole *et al.* 1979 en Rappole *et al.* 2000). Datos de distribución indican que la mayoría no siguen la misma ruta al norte en la primavera, en su lugar siguen una ruta más hacia el oeste paralela a la costa del Golfo (Rappole y Ramos 1994 en Rappole *et al.* 2000). Por otra parte, varias aves de esas especies, principalmente aves juveniles o aquellas poblaciones en el centro del continente, siguen una ruta que circunda el Golfo hacia el sur y el norte. Aunque este grupo incluye muchas aves migratorias que se reproducen en la parte Este de Norteamérica, solo aproximadamente 12 especies pueden servir como acarreadoras del West Nile virus, ya que la mayoría migran solas y no se reúnen ni en invierno ni durante la migración. Estas especies son: *Anas discors* (cerceta alazul), *Aythya collaris* (Pato pico-anillado), *Aythya affinis* (pato-boludo menor), *Fulica americana* (gallareta Americana), *Calidris alba* (playero blanco), *Calidris pusilla* (playero semipalmeado), *Calidris mauri* (playero occidental), *Calidris minutilla* (playero chichicuilote), *Limnodromus griseus* (costero picocorto), *Larus atricilla* (gaviota reidora), *Larus delawarensis* (gaviota picoanillado) (Rappole 1995).

### 5.5.4 Ruta de las Islas Caribeñas-Noroeste del Atlántico

Aproximadamente 70 especies de aves tienen poblaciones que pasan a través de Nueva York y cruzan el Oeste del Atlántico Norte o el Mar del Caribe hacia sus áreas de hibernación en las islas del Caribe o en Sudamérica. Esta ruta es elíptica al igual que la que atraviesa el Golfo de México, las aves siguen una ruta más hacia el oeste a través del Golfo de México o a lo largo de su orilla occidental en la primavera (Rappole 1979; Rappole 1994; Rappole 1995). Miembros de aproximadamente 22 especies de aves se

reúnen en bandadas durante la migración y durante el invierno siguiendo esta ruta; entre las especies que siguen esta ruta se encuentran, el playero blanco (*Calidris alba*), playero occidental (*Calidris mauri*), playero semipalmeado (*Calidris pusilla*) la gaviota pico anillado (*Larus delawarensis*) y la gaviota reidora (*Larus atricilla*).

## 5.6 WNV en Equinos

La mayoría de los caballos que han recibido la picadura por mosquitos que portan el WNV no desarrollan la enfermedad. De los caballos que si la desarrollan, aproximadamente una tercera parte de ellos presentan una enfermedad severa y mueren o son afectados a tal grado que se requiere aplicar eutanasia. El periodo de incubación varían entre un rango de siete a 14 días y pueden mostrar síntomas en un rango que varia de benigna hasta la muerte ([www.michigan.gov/mda](http://www.michigan.gov/mda)).

El WNV fue descubierto en caballos enfermos en Egipto y Francia a principios de los 60's. La aparición del virus en Norteamérica en 1999 en forma de una encefalitis epidémica puede ser una clave importante de la historia evolutiva del virus. En Octubre de 1999, WNV fue por primera vez confirmado como la causa de enfermedad en caballos en el Hemisferio Norte. Un 36% de los caballos enfermos murieron o fueron eutanizados (Ostlund, 2001). La enfermedad en caballos, causa parálisis de las patas y debilidad en su forma encefalomiélica (Aranda 2003). En 1999, 25 caballos en Long Island, New York presentaron señas clínicas de infección con el virus del Nilo Occidental. Las señas clínicas que se vieron en estos caballos incluyeron letargia, tropiezos y falta de coordinación, debilidad en las extremidades, ataxia, parálisis parcial, y muerte. Por lo general no se observó fiebre. Otras señas que pueden indicar infección con el virus del Nilo Occidental en los caballos incluyen deterioro de visión, inclino de la cabeza, convulsiones, no poder tragar, movimientos en círculos, sobre-excitabilidad, o coma (Rey 2001).

El Departamento de Alimentos y Agricultura de California 2003, reporto los siguientes signos en caballos: pérdida de coordinación, caminan en círculo, tropezando y cayendo, debilidad o parálisis parcial de las patas, espasmos musculares (especialmente

alrededor de la nariz y de los labios), incapacidad para pararse, labios flácidos y caídos, se chupan los labios y rechinan los dientes.

En Octubre de 1999, se confirmó el primer caballo infectado con Virus del Nilo en Nueva York; solo fue el primero de 25 más reportados infectados, y de ellos, 36% murieron (Ostlund *et al.* 2001). Para el año 2000 se presentaron 21 casos humanos (15 en Nueva York y 6 en New Jersey) y dos muerte (CDC 2000a). Se identificaron 65 casos de infección en caballos con severos daños neurológicos en 7 estados. En el caso de aves infectadas se reportaron un total de 4,139 aves provenientes de 133 condados de 12 estados, siendo los cuervos los de mayor frecuencia (CDC 2000b).

En el Estado de Nuevo León México en el 2003 se tomo tejido cerebral de un caballo adulto (12 años) muerto, el cual antes de morir presento síntomas neurológicos, no se pudo hacer aislamiento viral en células vero, pero se logro hacer secuenciación de la muestra, mostrando una alta relación filogenética con la cadena de WNV circundante en el área de Texas (Blitvich *et al.* 2004)

### **5.7 Vigilancia Epidemiológica en Equinos**

La Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales, cuenta con el programa de vigilancia epidemiológica activa de neuropatías en equinos, la vigilancia se realiza en campo mediante la búsqueda de casos clínicos de equinos que presentan signología de WNV.

En el verano del 2002, la SAGARPA recibió reportes de caballos con síntomas de encefalitis de varios Estados de México algunos de ellos colindantes a lo largo con la frontera de Texas como Tamaulipas, Coahuila y Chihuahua; se tomaron muestras de suero de equinos de 14 estados, los cuales fueron probados por ELISA en busca de anticuerpos IgG en donde de 441 muestras 97 (22%) tuvieron anticuerpos específicos para WNV, esto demostrando la dispersión del virus en seis estados de México: Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, y Yucatán (Estrada-Franco *et al.* 2003).

Un programa de vigilancia para detectar la infección del WNV en aves, caballos y humanos fue establecido en Cuba en el 2002; suero de caballos provenientes de la Habana fueron probados para anticuerpos en contra de WNV por el uso de ELISA, usando el anticuerpo monoclonal 3.1112G; probaron 210 sueros de los cuales 19 resultaron positivos para flavivirus (9%) de los cuales 4 fueron positivos para WNV dos provenientes de la Habana y otros de otras provincias (Pupo *et al.* 2006).

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

Epizootias de encefalitis en el Salvador mataron 203 caballos entre Noviembre del 2001 a Abril del 2003. Durante una investigación de brotes de enfermedades, 18 (25%) de 73 muestras de suero de equinos estables o muertos en el 2003 tuvieron anticuerpos neutralizantes para WNV, lo que sugiere que esta encefalitis ha extendido su rango y se esta dispersando en Centro América (Cruz *et al.* 2005).

### **5.8 Equinos como Hospederos Terminales**

Estudios llevados acabo en caballos en caballos por mucho tiempo no resolvieron la pregunta si equinos infectados con WNV producen niveles de viremia suficientes y con la duración necesaria para infectar a los mosquitos vectores. Un total de 12 caballos de diferentes razas y edades fueron infectados con WNV por medio de picaduras de mosquitos del genero *Aedes albopictus* previamente infectas con el virus; cuando las viremias en caballos estuvieron en su nivel más alto, los caballos se expusieron a mosquitos para que estos se alimentaran; donde todos los mosquitos que se alimentaron de estos caballos fueron negativos para el virus, lo que demuestra que los caballos no son importantes hospederos amplificadores del WNV en la naturaleza (Bunning *et al.* 2002)

## 5.9 Prueba de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

En esta prueba las reacciones antígeno-anticuerpo son monitoreadas enzimáticamente, este método se empezó a utilizar en los 80's para la identificación de alimentación sanguínea (Burkot *et al.* 1981).

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

## 6. MATERIAL Y METODO

### 6.1 Áreas de Estudio

Las áreas de estudio donde se llevaron acabo los muestreos de aves fueron en tres estados del Norte del País: Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas; los cuales conforman el Noreste México, para los tres estados los muestreos fueron en localidades rurales (Figura 1).



Figura 1. Mapa de México resaltando en color amarillo los estados donde se colectó.

## 6.2 Nuevo León

Sólo para el estado de Nuevo León se realizaron colectas en áreas dentro de la ciudad además de zonas rurales, y para fines prácticos se subdividió el estado en tres zonas: Norte, Centro y Sur este.

### 6.2.1 Zona Norte

Esta Zona comprende 32 municipios de todo el estado, de los cuales las colectas de aves se realizaron en los municipios de Lampazos en la localidad llamada Rancho Los Jabalíes, Santa María (29°98'817" N y 31°79'05" W), Sabinas Hidalgo en la localidad de la presa Sombretillo (26°18'30.9" N y 099°57'23.0" W), el Sabinal en Cerralvo (26°04'500"N y 99°63'639" W), El Carmen (25°52'56.9"N y 100°20'44.9" W), San Pedro Garza García (25°39'26.9"N y 100°24'36.4" W), Apodaca (25°78'139" N y 100°18'861" W), General Escobedo en la colonia Nueva Castilla (25°49'26.4" N y 100°16'28.6" W), Pesquería, en el ejido Francisco Villa (25° 47' N y 100° 03' W), Zuazua (25°89'528"N y 100°10'750" W), y Los Aldama en la localidad de El Tecolote (26° 01'42.5"N y 099° 17'25.6" W). La altitud en estas zonas oscila de 90 a 1200 msn, con una temperatura media anual de 20 a 24°C y una precipitación de 300 a 600 mm; los cultivos principales de esta zona son: sorgo, cártamo, trigo, aguacate, nogal, pastos y forrajes. Se considera una región de tipo árida, que es caracterizada por tener climas de tipo seco semicálido y el seco templado, con suelos con poca cantidad de materia orgánica, la vegetación está compuesta principalmente por matorrales medianos, inermes, crausulifolios y pastos nativos amacollados, medianos y halófilos, su aprovechamiento es ganadero con una superficie de 1'660,291 has. ([www.data.nl.gob.mx/Geografia/CartoBasica/NuevoLeon/Ecologicas](http://www.data.nl.gob.mx/Geografia/CartoBasica/NuevoLeon/Ecologicas)).

En cuanto a las áreas de estudio donde se tomaron muestras de suero de caballos, solo se tomo en cuenta el municipio y no las coordenadas, ya que se colecto en diferentes localidades de cada uno de estos. En donde para la zona norte de Nuevo León se colecto en los municipios de Higuera, Guadalupe, Monterrey, Salinas Victoria, Santa Catarina, Marín y Dr. González.

### 6.2.2 Zona Centro

Esta comprendido por siete municipios de los cuales las colectas de aves fueron en: Cadereyta ( $100^{\circ} 02'01.8''$  W y  $25^{\circ} 36'05.5''$  N), Juárez en la localidad de San Roque ( $100^{\circ}10'54.4''$  W y  $25^{\circ}33'20.9''$  N). Para sueros de caballos los municipios de colecta además de estos dos últimos fueron: Linares y Montemorelos. Esta zona alcanza una altitud que va de los 150 a 800 msm, con una temperatura media anual de 20 a  $24^{\circ}\text{C}$  y con una precipitación de 600 a 1000 mm, los cultivos principales de esta región son: maíz, sorgo, forrajes, cítricos y nogal. Se considera una región semiárida predomina la vegetación arbórea y arbustiva, matorrales y bosques de mezquite, algunas áreas presentan agrupaciones de halófitas y pastos halófitos, su aprovechamiento es la ganadería con una extensión de 3'905,809 hectáreas ([www.data.nl.gob.mx/Geografia/](http://www.data.nl.gob.mx/Geografia/CartoBasica/NuevoLeon/Ecologicas)CartoBasica/NuevoLeon/Ecologicas).

### 6.2.3 Zona Sur-Este

Comprende nueve municipios en donde las colectas de aves se llevaron a cabo en los municipios de Santiago, en la localidad de el Barreal ( $25^{\circ}29'26''$  N, y  $100^{\circ}10'45.5''$  W), y Aramberri en la localidad de San Juan y Puentes ( $24^{\circ}09'54.1''$  N y  $100^{\circ}03'54.4''$  W). Para sueros de caballos los municipios de colecta además de estos dos últimos fueron: Dr. Arroyo y Zaragoza. La altitud va de los 600 a 3700 msm con una temperatura de  $12^{\circ}$  a  $20^{\circ}\text{C}$  y una precipitación de 300 a 1000 mm, los cultivos principales son: maíz, frijol, trigo, alfalfa, papa y manzano. Esta es una región que se caracteriza por tener el clima de tipo templado subhúmedo y semiseco templado, su fisiografía está conformada por sierras, mesetas y escarpadas con pendientes mayores al 70%, su vegetación se caracteriza por bosques, dominada por diversas arbóreas de pinos y encinos, bosques de *Juniperus* su aprovechamiento es ganadero y forestal, con una extensión de 889,400 hectáreas (Figura2), ([www.data.nl.gob.mx/Geografia/](http://www.data.nl.gob.mx/Geografia/CartoBasica/NuevoLeon/Ecologicas)CartoBasica/NuevoLeon/Ecologicas)

### 6.3 Tamaulipas

En el estado de Tamaulipas existe una diversidad de climas en todo su territorio, originando diferentes volúmenes de precipitación lo que ocasiona una distribución irregular de las aguas superficiales en cantidad y calidad. Existe una gran variedad de comunidades vegetales que resultan de la conjunción de reinos holártico y neotropical, incluyendo tres regiones y cuatro provincias florísticas (tamaulipas.gob.mx).

Los Municipios donde se llevaron acabo las colectas de aves fueron: San Fernando, en las localidades de El Refugio (24°56'44" N, y 97°43'44" W), Rancho Las Carreras (24°32'30.4" N y 097°45'01.0" W), y Rancho de la Fuente (24°26'59" N y 97°56'1.7" W), municipio de Soto La Marina, en la localidad de la Pesca (23°47'43.9" N y 097°53'02.5" W), municipio de Matamoros en la localidad del Mezquital en el Rancho el Carrizal (25°35'46.9" N y 097°23'10.2" W), municipio de Nuevo Guerrero, en la localidad de la Presa Falcón (26°33'54.3" N y 099°11'53.4" W), y el municipio de Valle hermoso (25°30'13.10" N y 97°41'46.5" W), (Figura 2).

La vegetación presente en estas áreas de estudio fue principalmente el matorral espinoso Tamaulipeco que se describe como una comunidad arbustiva con fisonomía de matorral espinoso, y en ocasiones subinerme, que representa solo en áreas del sur de Texas, del norte de Tamaulipas y Nuevo León y del noreste Coahuilense. Este tipo de matorral es una comunidad transicional entre los matorrales desérticos de las zonas áridas norteamericanas y las selvas y matorrales submontanos de climas más húmedos. En Tamaulipas tiene su distribución en el norte y noreste del estado, se extiende desde los 0 hasta los 850 msnm. (H. Muller en 1947). Otro de los tipos de vegetación fueron los mezquiales (*Prosopis spp.*), especie que desarrolla un fuste bien definido, y que en la mayoría de los casos sobrepasa los cuatro metros de altura. Los suelos son gravosos, arenosos y profundos en los valles, pedregosos y someros en lomeríos, usualmente con buen drenaje. La temperatura media anual es de 21° C y la precipitación media anual fluctúa entre los 300 y los 635 milímetros (tamaulipas.gob.mx).

## 6.4 Coahuila

El estado de Coahuila se encuentra en el centro de la parte septentrional de la República. Limita al norte con los Estados Unidos de América; al oriente con el estado de Nuevo León; al sur con los estados de San Luis Potosí, Zacatecas y Durango, y al poniente con Durango y Chihuahua. Respecto a su localización, está situado entre los  $24^{\circ} 32' 29'' 51'$  de latitud norte y entre los  $99^{\circ} 58' 103^{\circ} 57'$  de longitud oeste respecto del Meridiano de Greenwich ([www.coahuila.gob.mx](http://www.coahuila.gob.mx)).

El marco orográfico del estado es sumamente irregular debido a la presencia de la Sierra Madre Oriental, que atraviesa la entidad de sur a norte por la región central-oriental, dando origen a un complejo de sierras y lomeríos que se extienden en toda la entidad. Entre ellas destacan la Sierra Madre Oriental, que constituye el sistema montañoso vertebral del estado y que con sus ramificaciones cubre el este y el sureste. La flora de Coahuila corresponde a los 3 tipos de biomas o regiones naturales: Templado frío, tropical y zonas áridas. En el ecosistema templado frío los tipos de vegetación presentes son pino, pino-encino, oyamel, otras coníferas, encino y bosque de galería. En el tropical encontramos palmar y selvas bajas. En las zonas áridas es fácil identificar mezquital, huizachal, chaparral, matorral subtropical, matorral submontano, matorral espinoso y matorral Xerófilo ([www.coahuila.gob.mx](http://www.coahuila.gob.mx)).

Las colectas de aves se realizaron en tres municipios de este estado los cuales fueron, Muzquiz en la localidad de rancho La Escondida ( $32^{\circ}03'888''$  N y  $22^{\circ}09'03''$  W), Jiménez ( $29^{\circ}04'06.5''$  N y  $100^{\circ}39'59.4''$  W), Morelos en la localidad de la Casita ( $28^{\circ}25'16.7''$  N y  $100^{\circ}49'37.7''$  W). Las colectas de suero de equinos para este estado se realizaron en los municipios de Ciudad Acuña y Saltillo. (Figura 2).

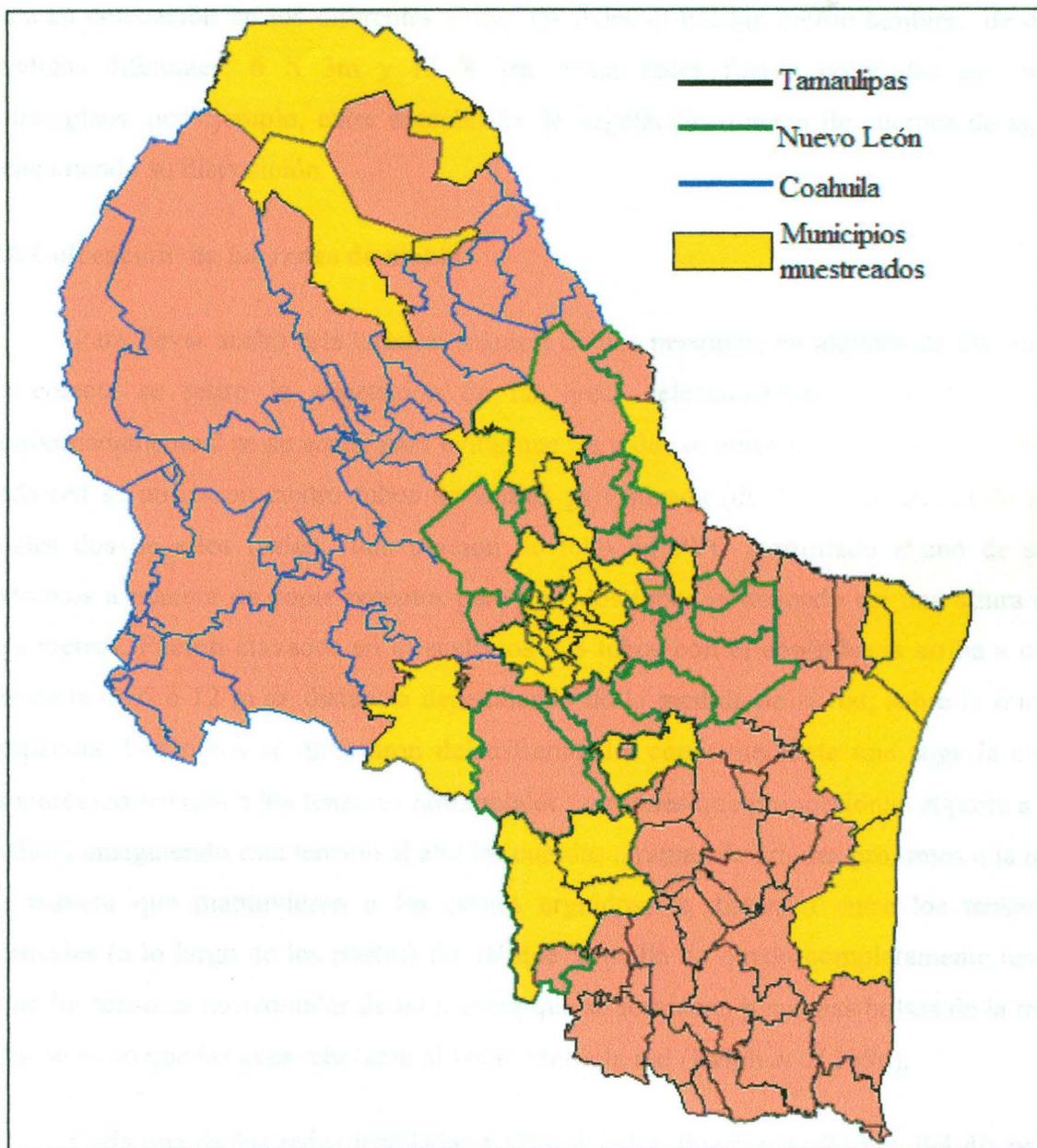


Figura 2. Mapa de los Estados que conforman el noreste de México, y los municipios donde se realizaron las colectas tanto de aves como de suero de caballos.

### 6.5 Colecta de aves

Las colectas de aves migratorias y residentes fueron llevadas a cabo alrededor de cada 2 a 3 semanas, las cuales tuvieron duraciones promedio de 3 días. Para la captura de las aves se utilizaron de 15 a 30 redes de niebla, dependiendo de las áreas disponibles

para su colocación en los diferentes sitios; las redes utilizadas fueron también de dos medidas diferentes: 6 X 3m y 12 X 3m. Estas redes fueron colocadas en sitios estratégicos, por ejemplo, entre manchones de vegetación o cerca de cuerpos de agua dependiendo su disposición.

#### **6.6 Colocación de las redes de niebla**

Para llevar acabo esta tarea se requirió de dos personas; en algunos de los sitios de colecta se retiro la vegetación de las áreas seleccionadas en una franja de aproximadamente 2 m de ancho para evitar que las redes se enredaran y se dañaran. Para cada red se utilizaron cuatro tubos de lamina galvanizada (de 1.5 m de altura) de los cuales dos de ellos tenían una porción de tubo de PVC atornillado a uno de sus extremos a manera de cople receptor para unir dos tubos obteniendo así una altura de tres metros. Fueron clavados en el suelo los dos tubos con el cople hacia arriba a una distancia de 6 o 12 m de distancia dependiendo de la medida de la red, sobre la franja despejada. Los tubos se amarraron del extremo del cople mediante una soga la cual proporciono tensión a los tensores horizontales (cordones que proporcionan soporte a la malla) consiguiendo esta tensión al atar las cuerdas a ramas de árboles próximos a la red de manera que mantuvieron a los postes erguidos; la distancia entre los tensores verticales (a lo largo de los postes) fue tal que la malla no quedo completamente tensa entre los tensores horizontales de tal manera que se formaban pequeñas bolsas de la red, y así se evito que las aves rebotaran al volar contra la red (Ralph *et al.* 1996).

Cada una de las redes instaladas fueron dejadas abiertas las 24 hrs. del día para capturar incluso aves nocturnas. La revisión de las redes fue llevada acabo en intervalos de 10 a 15 minutos. Las aves que fueron atrapadas en las redes fueron desenredadas cuidadosamente a manera de no dañarlas y así mismo fueron colocadas dentro de bolsas de manta provistas de jareta en las cuales fueron trasladadas a los campamentos de trabajo (Ralph *et al.* 1996).

## **6.7 Toma de muestra en aves**

Los ejemplares colectados fueron identificados a nivel de especie por medio de guías de identificación aves (Alsop 2001; Fitzpatrick 2000). La toma de muestra de sangre fue realizada mediante la técnica de punción de la vena yugular, en la que se tomó al ave con la mano izquierda colocando su cabeza entre dedo índice y medio de tal forma que fue doblado el cuello del ejemplar para que la vena yugular quedara expuesta; en este punto se limpio el área de la vena con torundas de algodón con alcohol etílico, y la toma de muestra sanguínea fue por medio de jeringas de insulina, con las cuales se obtuvo entre 0.05 a 0.1 cc de sangre, esto dependiendo del tamaño del ejemplar. En aves del orden Columbiformes y Strigiformes, la toma de muestra fue hecha por punción de una de las venas del ala. Posteriormente los ejemplares fueron regresados a las bolsas de manta por unos minutos para esperar a que la punción hecha por la aguja se cerrara, y después de esto ser liberadas.

Cada una de las muestra obtenidas fueron colocadas en un tubo eppendorf de 1.5 ml, etiquetado con su numero correspondiente, los cuales contenían un ml de buffer de fosfato salino (PBS) con 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina). Los tubos conteniendo la muestra fueron colocados en hielo para mantenerlos y trasladarlos al laboratorio de Entomología Medica, FCB, UANL.

## **6.8 Muestreo en caballos**

Las colectas de sangre en equinos fueron llevadas a cabo alrededor de cada 2 a 3 semanas, las cuales consistieron en recorrer localidades completas en busca de caballos a los cuales se les extraía la muestra.

### **6.8.1 Toma de muestra**

La toma de muestra de sangre en equinos fue realizada mediante jeringas de 5ml haciendo una punción directa a la vena yugular del animal mientras otra persona lo detenía de la rienda por seguridad; se extraían cinco ml. de sangre los cuales se pusieron en tubos venojet de 100 X 12-13 ml. con heparina para posteriormente

colocarlos en hielo para su transportación al laboratorio de Entomología Medica, FCB, UANL.

### **6.9 Procesamiento de las muestras en laboratorio**

En el laboratorio se procedió a centrifugar cada una de las muestras tanto de aves como de equinos a 10,000 rpm por 10 minutos para obtener sólo el suero (sobrenadante) el cual se colocó en tubos nuevos y se descartó el paquete celular y en este punto se pueden congelar las muestras hasta la realización de la ELISA.

### **6.10 Técnica de ELISA**

Una ELISA en la modalidad de bloqueo fue usada para la detección de anticuerpos neutralizantes en sangre descrita por Blitvich (Blitvich et al.2003). El primer paso de esta prueba consiste en la sensibilización de las placas diseñadas para esta prueba las cuales fueron la matriz sólida (Placa de 96 pozos, fondo plano, Cat No. 07-200-642. FISHER). La sensibilización es tomar los 60 pozos de la parte interna de la placa a los cuales se les adiciono 100µl del antígeno viral diluido en una solución de Carbonato-bicarbonato a una dilución de 1: 1000 dejando incubar la placa por 48 hrs. a 4° C.

Para un litro de solución Carbonato – Bicarbonato: 50 mM de carbonato de sodio (5.3 gramos), 50 mM de bicarbonato de sodio (4.2 gramos) y se ajusta el pH a 9.6 con ácido clorhídrico 10M.

Una vez que transcurrieron las 48 hrs. se lavaron las placas 4 veces con PBS + 0.1% de Tween 20 agregando 200µl por cada pozo por lavado. Ahora se agregó a cada pozo 200µl de buffer de bloqueo el cual consta de PBS con 0.1% de Tween 20 y 5% de leche en polvo sin grasa y se incubo a 37° C por 45 minutos. Mientras esta incubación se llevo a cabo se diluyeron los sueros de aves y caballos en una proporción de 1:10 con un volumen final de 50 µl para aves y 60µl para caballos; por placa se añadieron tres controles positivos y cinco negativos.

Después de los 45 minutos se lavó la placa 4 veces y se procedió a añadir los sueros previamente diluidos y se puso a incubar a 37° C por 2 hrs.

El siguiente paso fue diluir el anticuerpo monoclonal (Chemicon Internacional, WNV/Kunjin virus MAb 3:1112G) en buffer de bloqueo a una proporción de 1:1400. Transcurridos las 2 hrs. se lavó la placa 4 veces y se añadieron 75µl del anticuerpo a cada pozo y se puso a incubar a 37° C por 1 hr.

El siguiente paso fue hacer la dilución del conjugado de peroxidasa (HRP-Goat anti mouse IgG, Laboratorios Zymed, Cat No. 61-6520) que es en una proporción de 1:200. Después de la hora de incubación se lavo la placa 4 veces y se añadieron 75µl del conjugado por pozo y se puso a incubar a 37° C por 1 hr.

El siguiente paso fue lavar la placa 4 veces y añadir 75 µl de la solución reveladora la cual fue ABTS solución A y solución B a una proporción de 1:1 (Laboratorios KPL, Cat No. 50-62-00). En donde a diferencia de la ELISA convencional las muestras positivas no presentaron color.

Se midieron las densidades ópticas (OD) a 405 nm. Se tomaron dos mediciones, una a los 15 min. y la otra a los 30min. Se calculo el porcentaje del valor de inhibición de la prueba del suero; para ser positiva una muestra debe ser mayor al 30% de absorbancia.

#### **6.10.1 Análisis de las OD**

El análisis de los datos fue hecho por medio de la formula de Hall con la cual obtuvimos los porcentajes de inhibición se muestra en la figura 3 (Hay *et al.* 1995) (Figura 3).

$$\% \text{ de inhibición} = -100 \left\{ \left[ \frac{D_o - B_g}{D_oN - B_g} \right] 100 \right\}$$

Figura 3. Formula de Hall para obtener los porcentajes de inhibición de la técnica de ELISA, donde  $D_o$ = Densidad óptica de las muestras,  $D_oN$ = Densidad óptica de los negativos, y  $B_g$ = Back ground el cual es la media de la sumatoria de 5 pozos en blanco.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Aves colectadas

Se llevaron a cabo un total de 50 muestreos paralelos de aves en los tres estados, durante el periodo: Diciembre 12 del 2001-Abril 16 del 2004. Se colectaron un total de 1,686 aves, las cuales fueron identificadas a nivel de especie. Las aves colectadas corresponden a 13 órdenes (Tabla I), 38 familias (Tabla II), 86 géneros y 123 especies. Los ordenes mas representativos por tener mayor número de ejemplares capturadas fueron Passeriformes con 1248 (74.02%) ejemplares y después Columbiformes con 282 (16.72%) (Apéndice 1).

TABLA I

Ordenes de aves y número de ejemplares colectados en cada uno de los tres estados colectados.

ÓRDEN	No. de Ejemplares colectados		
	TAM	NL	COAH
Anseriformes	12	-	-
Caprimulgiformes	18	8	1
Charadriiformes	4	4	-
Ciconiiformes	-	-	1
Columbiformes	204	66	12
Coraciiformes	-	2	-
Cuculiformes	7	3	1
Falconiformes	1	3	-
Galliformes	6	11	-
Gruiformes	4	-	-
Passeriformes	772	357	119
Piciformes	37	23	-
Strigiformes	5	5	4
TOTAL	1070	462	138

TABLA II

Familias y número de ejemplares colectados por estado y ordenados filogenéticamente, durante el periodo de estudio

Familia	Tamaulipas	Nuevo León	Coahuila	Total
Anatidae	12	-	-	12
Phasianidae	-	7	-	7
Odontophoridae	6	4	-	10
Cathartidae	-	-	1	1
Accipitridae	1	3	-	4
Rallidae	4	-	-	4
Charadriidae	1	-	-	1
Scolopacidae	2	-	-	2
Laridae	1	-	-	1
Columbidae	204	67	12	283
Cuculidae	7	3	1	11
Strigidae	5	5	3	13
Caprimulgidae	18	7	1	26
Alcedinidae	-	2	-	2
Picidae	38	33	-	72
Tyrannidae	108	22	19	152
Laniidae	1	-	-	1
Vireonidae	67	6	4	78
Corvidae	6	4	-	10

Tabla II. (Continuación).

Paridae	4	4	6	14
Remizidae	10	15	2	27
Troglodytidae	23	4	5	32
Sylviidae	4	4	-	8
Muscicapidae	1	-	-	1
Turdidae	-	7	2	9
Mimidae	244	31	6	285
Motacillidae	2	-	-	2
Parulidae	55	24	12	91
Thraupidae	-	1	-	1
Emberizidae	86	61	17	164
Cardinalidae	93	55	39	181
Icteridae	75	21	2	98
Fringillidae	-	3	6	9
Passeridae	5	69	-	74

En el estado de Tamaulipas fueron colectadas 1,070 (63.46%) aves de Diciembre 12 del 2001 al 6 de feb del 2004 en un total de 18 colectas llevadas acabo en 9 localidades. Para Nuevo León se realizaron 36 colectas en 22 localidades del 7 de Agosto del 2002 al 15 de Abril 2004, capturando 462 (27.42%) aves, y para el estado de Coahuila solo se realizaron tres muestreos en tres localidades del 6 de Mayo 2003 a 27 de Septiembre 2003, obteniendo 138 (8.16%) aves colectadas (Tabla III).

TABLA III

Localidades de colecta para los estados de Tamaulipas (Tamps), Nuevo León (N.L.), y Coahuila (Coah): número de colectas realizadas por localidad (No. Col.), número de individuos (No. Individuos) y porcentaje relativo (%).

Estado	Localidad	No. Col.	No. Indiv.	%
Tamps.	El Carrizal, Matamoros 20-Mar-03	1	136	8.11
Tamps.	La Pesca 12-Sep-03- 21-Nov-03	3	78	4.65
Tamps.	Presa Falcón, Nueva Guerrero. 13-Nov-03	1	18	1.07
Tamps.	R. De La Fuente San Fernando 20-Ago-03	1	72	4.29
Tamps.	R. Las Carreras. Mpo. San Fernando 7-Jun-02-6-Feb-04	12	504	30.42
Tamps.	U.M.A El Refugio. Mpo. San Fernando 12-Dic-01-9-Feb-02	5	199	11.87
Tamps.	Valle Hermoso 18-Oct-02	1	63	3.75
N.L.	Apodaca 29-Ago-02- 13-Abr-04	2	19	1.13
N.L.	Ejido Francisco Villa, Pesquería. 3-Abr-03-3-Jun-03	2	28	1.67
N.L.	El Barreal, Santiago 13-Abr-04	1	14	.83
N.L.	El Carmen 19-Mar-04	1	43	2.56
N.L.	El Sabinal. Cerralvo 6-Sep-02	1	1	.05
N.L.	El tecolote. Aldamas 2-Jul-03	1	34	2.02
N.L.	Mpo. Zuazua 21-28-Ago-02	2	10	.59
N.L.	Nueva Castilla. Mpo. Escobedo 14-Ago-02- 15-Abr-04	6	123	7.33
N.L.	Presas Sombrerete, Sabinas Hgo. 23-Oct-03	1	25	1.49
N.L.	Puentes, Aramberri 8-Feb-03-Mar-03	2	14	.83
N.L.	Riío San Juan, Cadereyta 15-Abr-04	1	9	.53

TABLA III. (Continuación).

N.L.	San Roque, Juárez 14-Abr-04	1	2	.11
N.L.	Sta. Maria, Lampazos 13-Feb-03	1	133	7.93
N.L.	UDEM San Pedro Garza García 15-Abr-04	1	7	.41
Coah.	Jiménez	1	97	5.78
Coah.	La Escondida, Muzquiz	1	31	1.84
Coah.	Rancho La Casita, Morelos	1	10	.59
Total		50	1676	100

De las 1,070 aves colectadas para el estado de Tamaulipas, las cinco especies con mayor abundancia fueron: *Mimus polyglottos* (centzontle norteño) n=153, *Columbina passerina* (Tortola coquita) n= 149, *Cardinalis cardinalis* (cardenal rojo) n= 67, *Vireo griseus* (vireo ojos blancos n= 61 y *Toxostoma longirostre* (cuitlacoche pico largo) n= 59. Para Nuevo León esta relación fue de: *Passer domesticus* (gorion casero n=65, *Columbina passerina* (Tortola coquita) n= 53, *Melanerpes aurifrons* (carpintero cheje) n=32, *Cardinalis sinuatus* (cardenal pardo) n= 23, y *Cardinalis cardinalis* (cardenal rojo) n= 20. Para el estado de Coahuila fue de: *Cardinalis cardinales* (cardenal rojo) n=16, *Myiarchus cinerascens* (papamoscas cenizo) n= 13, *Passerina caerulea* (picogordo azul) n= 9, y *Passerina ciris* (colorin sietecolores) n= 9.

Del total de aves colectadas, 1,291 (76.57%) fueron residentes y 377 (23.36%) fueron migratorias (Tabla IV). Por Estados los resultados fueron: Tamaulipas 856 (80%) residentes y 214 (20%) migratorias; para Nuevo León 351 (75.97%) y 111 (24.02%), y para Coahuila 84 (60.86%) y 54 (39.13%) respectivamente (Tabla V).

TABLAIV

Número y porcentaje de aves residentes y migratorias y su incidencia por estado

<b>Estado</b>	<b>Residentes: No. y %</b>	<b>Migratorias: No. y %</b>
Tamaulipas	856 (80%)	214 (20%)
Nuevo Leon	351 (75.97%)	111 (24.02%)
Coahuila	84 (60.86%)	54 (39.13%)
<b>Total</b>	<b>1,291 (76.57%)</b>	<b>377 (23.36%)</b>

TABLA V

Lista de especies de aves, relación residentes- migratorios, para los estados del Noreste de México: Tamaulipas (1), Nuevo León (2), y Coahuila (3) en orden filogenético

Familia	Residentes		Migratorios	
	Estados	Géneros	Estados	Géneros
Anatidae			1	<i>Anas discors</i>
			1	<i>Aythya americana</i>
Phasianidae	2	<i>Gallus gallus</i>		
Odontophoridae	1	<i>Colinus virginianus</i>		
	2	<i>Callipepla squamata</i>		
Cathartidae	3	<i>Cathartes aura</i>		
Accipitridae			2	<i>Accipiter striatus</i>
			1,2	<i>Accipiter cooperii</i>
Rallidae	1	<i>Fulica americana</i>		
Charadriidae	1	<i>Charadrius vociferus</i>		
Scolopacidae			1	<i>Actitis macularia</i>
			1	<i>Numenius americanus</i>
Laridae			1	<i>Sterna forsteri</i>
Columbidae	1,2,3	<i>Zenaida macroura</i>		
	2	<i>Zenaida asiatica</i>		
	1,2,3	<i>Columbina inca</i>		
	1,2,3	<i>Columbina passerina</i>		
	1	<i>Leptotila verreauxi</i>		
Cuculidae	2,3	<i>Coccyzus americanus</i>		
	1,2	<i>Crotophaga sulcirostris</i>		
Strigidae	3	<i>Micrathene withneyi</i>		
	1,2	<i>Otus asio</i>		
	2,3	<i>Otus kenicoti</i>		
Caprimulgidae	1,2	<i>Chordeiles minor</i>	2	<i>Chordeiles acutipennis</i>
	1	<i>Nyctidromus albicollis</i>	1,2,3	<i>Caprimulgus vociferus</i>
Alcedinidae	2	<i>Ceryle torquatus</i>		
	2	<i>Chloroceryle americana</i>		
Picidae	1,2	<i>Melanerpes aurifrons</i>		
	1,2	<i>Picoides scalaris</i>		
Tyrannidae	1	<i>Camptostoma imberbe</i>	1	<i>Empidonax flaviventris</i>
	1,2	<i>Pitangus sulphuratus</i>	1,2,3	<i>Sayornis phoebe</i>
	1	<i>Myiozetetes similis</i>	1,2,3	<i>Myiarchus cinerascens</i>
	1,3	<i>Tyrannus melancholicus</i>	1	<i>Myiarchus tyrannulus</i>
	1	<i>Tyrannus couchii</i>	1	<i>Myiarchus crinitus</i>
	1,3	<i>Tyrannus vociferans</i>	1	<i>Tyrannus tyrannus</i>
			1	<i>Tyrannus forficatus</i>
		1,2	<i>Polioptila caerulea</i>	

TABLA V (Continuación).

Familia	Residentes		Migratorios	
	Estados	Géneros	Estados	Géneros
Vireonidae	1,2,3	<i>Vireo griseus</i>	1,2	<i>Vermivora ruficapilla</i>
	2,3	<i>Vireo atricapilla</i>	1	<i>Vireo olivaceus</i>
			1	<i>Vireo flavoviridis</i>
			2	<i>Vireo solitarius</i>
Corvidae	1,2,	<i>Cyanocorax yncas</i>		
	2	<i>Cyanocorax morio</i>		
	2	<i>Corvus imparatus</i>		
Paridae	1		1,2,3	<i>Baeolophus bicolor</i>
Remizidae	1,2,3	<i>Auriparus flaviceps</i>		
Troglodytidae	1	<i>Campylorhynchus brunneicapillus</i>	1	<i>Troglodytes aedon</i>
	1,2,3	<i>Thryomanes bewickii</i>		
	2	<i>Salpinctes obsoletus</i>		
Sylviidae	2	<i>Polioptila melanura</i>	1	<i>Passerina cyanea</i>
	1	<i>Polioptila nigriceps</i>		
Turdidae	3	<i>Sialia mexicana</i>	1	<i>Hylocichla mustelina</i>
	2	<i>Turdus grayi</i>	2,3	<i>Catharus guttatus</i>
Mimidae	1,2,3	<i>Mimus polyglottos</i>	1	<i>Dumetella carolinensis</i>
	1,2,3	<i>Toxostoma longirostre</i>		
	1,2	<i>Toxostoma curvirostre</i>		
Motacillidae			1	<i>Anthus spragueii</i>
Parulidae			1,2	<i>Vermivora celata</i>
			1	<i>Parula americana</i>
			1,3	<i>Dendroica petechia</i>
			1	<i>Dendroica coronata</i>
			1,3	<i>Mniotilta varia</i>
			1	<i>Helmitheros vermivora</i>
			1	<i>Seiurus auricapilla</i>
			1	<i>Seiurus noveboracensis</i>
			1,3	<i>Geothlypis trichas</i>
			1	<i>Oporornis formosus</i>
			1	<i>Wilsonia citrina</i>
			2	<i>Wilsonia pusilla</i>
			1,3	<i>Icteria virens</i>

TABLA V (Continuación).

Familia	Residentes		Migratorios	
	Estados	Géneros	Estados	Géneros
Emberizidae	1,2,3	<i>Arremonops rufivirgatus</i>	2	<i>Spizella passerina</i>
	1,2	<i>Aimophila cassinii</i>	2	<i>Spizella pallida</i>
	3	<i>Aimophila ruficeps</i>	2,3	<i>Spizella breweri</i>
	2	<i>Amphispiza bilineata</i>	1,2,3	<i>Chondestes grammacus</i>
			2	<i>Calamospiza melanocorys</i>
			1	<i>Passerculus sandwichensis</i>
			1,2	<i>Ammodramus savannarum</i>
			1,2	<i>Melospiza lincolni</i>
Cardinalidae			2	<i>Zonotrichia leucophrys</i>
	3	<i>Rhodothraupis celaeno</i>	1,2,3	<i>Passerina caerulea</i>
	1,2,3	<i>Cardinalis cardinalis</i>		<i>Passerina cyanea</i>
	1,2	<i>Cardinalis sinuatus</i>	1,2,3	<i>Passerina ciris</i>
	3	<i>Pheucticus melanocephalus</i>	2	<i>Spiza americana</i>
Icteridae	1,2,3	<i>Passerina versicolor</i>		
	1	<i>Agelaius phoeniceus</i>	1,2	<i>Sturnella neglecta</i>
	1	<i>Sturnella magna</i>	1,3	<i>Molothrus ater</i>
	1,2	<i>Quiscalus mexicanus</i>	3	<i>Icterus parisorum</i>
	3	<i>Molothrus bonariensis</i>		
	1	<i>Molothrus aeneus</i>		
	2	<i>Icterus spurius</i>		
	1,2	<i>Icterus cucullatus</i>		
	1	<i>Icterus gularis</i>		
2	<i>Icterus graduacauda</i>			
Fringillidae			2,3	<i>Carduelis psaltria</i>
	3	<i>Carpodacus mexicanus</i>		
Passeridae	1,2	<i>Passer domesticus</i>		

Las familias de aves con mayor abundancia de especies tanto residentes como migratorias fueron Tyrannidae con seis y ocho, Emberizidae con cuatro y nueve, Icteridae con nueve y tres, y Cardinalidae con cinco y cuatro respectivamente, destacando la familia Parulidae con 13 especies las cuales todas fueron migratorias (Tabla V). Así mismo las cinco especies migratorias colectadas con mayor frecuencia en los tres estados durante todo el periodo de estudio fueron: *Myiarchus tyrannulus* (33), *Melospiza lincolni* (26), *Sayornis phoebe* (24), *Vermivora celata* (23) e *Icteria virens* (20). Por estado esto se comporto diferente, ya que para Tamaulipas fueron: *Myiarchus*

*tyrannulus* (33), *Melospiza lincolnni* (20), *Sayornis phoebe* (17), *Vermivora celata* (17), *Icteria virens* (13). Para Nuevo León: *Calamospiza melanocorys* (10), *Dendroica coronata* (9), *Spizella passerina* (8) y *Sayornis phoebe* (6), *Vermivora celata* (6), y *Melospiza lincolnni* (6) individuos cada una. Para el estado de Coahuila las especies fueron: *Passerina ciris* (9), *Passerina caerulea* (9), *Chondestes gramacus* (7), *Icteria virens* (7) y *Baelophus bicolor* (6).

### 7.1.2 Aves Seropositivas para WNV

De las 1,686 aves colectadas, 90 resultaron seropositivas al WNV por medio de la prueba de ELISA de bloqueo para la detección de anticuerpos neutralizantes para este virus; 43 en Nuevo León, 39 en Tamaulipas, y 8 para el estado de Coahuila en todo el período de estudio (Figura 4, 5, 6). Las especies seropositivas correspondieron a los órdenes, Galliformes, Falconiformes, Columbiformes, Cuculiformes, Strigiformes, Piciformes, y Passeriformes; dentro de un total de 20 familias y 39 especies (Tabla VI).

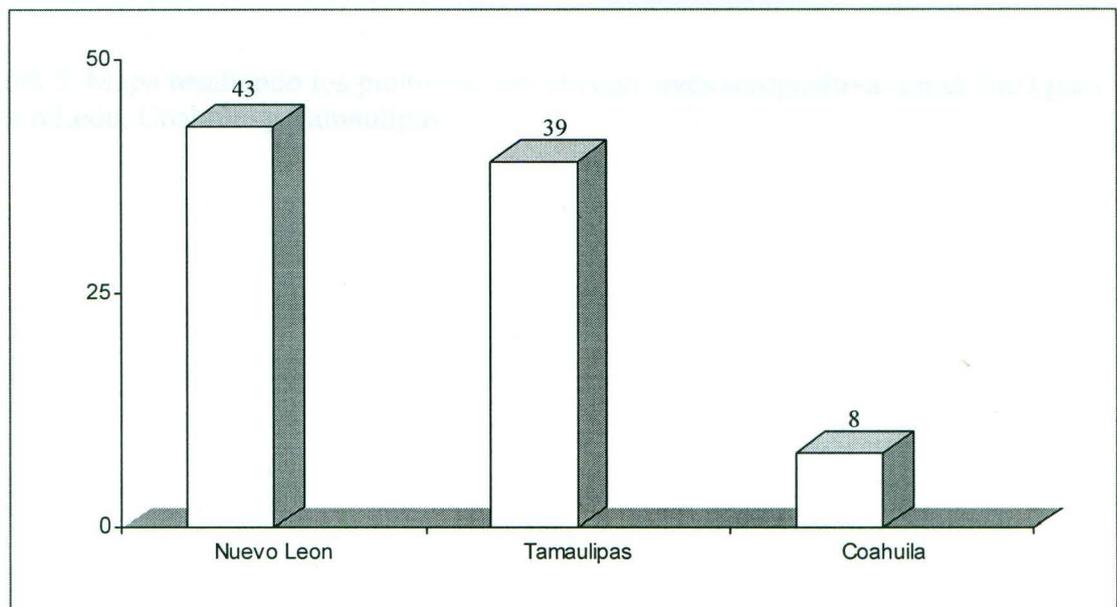


Figura 4. Numero de aves seropositivas a WNV para los estados del Noreste de México.

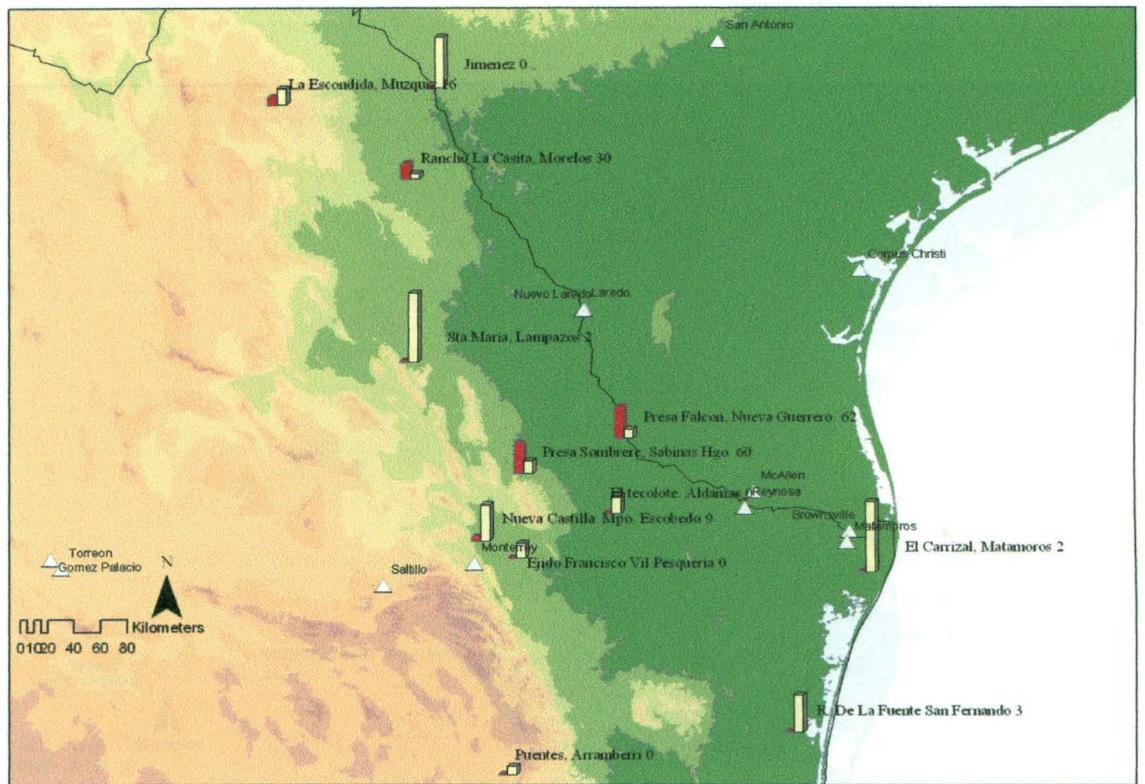


Figura 5. Mapa resaltando los puntos de colecta con aves seropositivas en el 2003 para Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas.

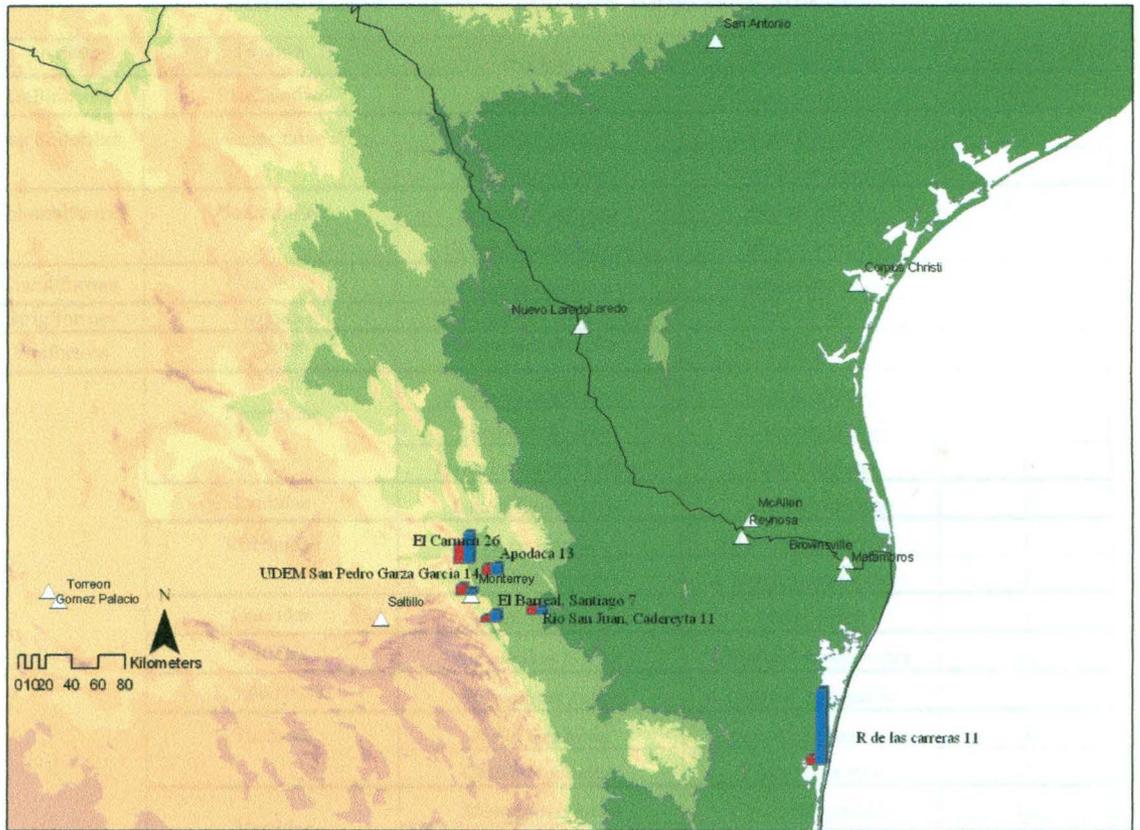


Figura 6. Mapa resaltando los puntos de colecta con aves seropositivas en el 2004 para Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas.

TABLA VI

Aves seropositivas para WNV mediante la prueba de ELISA para los estados del Noreste de México, ordenadas filogenéticamente

Orden	Familia	Especie	Nombre común	Estado
Galliformes	Phasianidae	<i>Gallus gallus</i>	Gallo domestico	1,2
Falconiformes	Accipitridae	<i>Accipiter striatus</i>	Gavilán pecho-rufo	2
		<i>Accipiter cooperii</i>	Gavilán de Cooper	2
Columbiformes	Columbidae	<i>Zenaida macroura</i>	Paloma huilota	1,2,3
		<i>Columbina passerina</i>	Tórtola coquita	1,2
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	Garrapatero pijuy	1
Strigiformes	Strigidae	<i>Micrathene withneyi</i>	Tecolote enano	3
Piciformes	Picidae	<i>Melanerpes aurifrons</i>	Carpintero cheje	1,2
Passeriformes	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Luis bienteveo	1
		<i>Sayornis phoebe</i>	Papamoscas fibi	1,2
		<i>Tyrannus melancholicus</i>	Tirano tropical	1
	Laniidae	<i>Lanius ludovicianus</i>	Alcaudón verdugo	1
	Vireonidae	<i>Vireo griseus</i>	Vireo ojos blancos	1
		<i>Vireo atricapillus</i>	Vireo gorra negra	2
	Corvidae	<i>Cyanocorax yncas</i>	Chara verde	1
	Paridae	<i>Baeolophus bicolor</i>	Cabonero cresta negra	2,3
	Troglodytidae	<i>Troglodytes aedon</i>	Chivirin saltapared	1
	Turdidae	<i>Sialia mexicana</i>	Azulejo garganta azul	3
		<i>Catharus guttatus</i>	Zorzal cola rufa	3
	Mimidae	<i>Mimus polyglottos</i>	Cenzontle norteño	1,2
		<i>Toxostoma longirostre</i>	Cuitlacoche pico largo	1,2
		<i>Toxostoma curvirostre</i>	Cuitlacoche pico curvo	1
	Parulidae	<i>Dendroica coronata</i>	Chipe coronado	2
		<i>Mniotilta varia</i>	Chipe trepador	2
		<i>Wilsonia pusilla</i>	Chipe corona negra	2
		<i>Icteria virens</i>	Buscabreña	1
	Emberizidae	<i>Spizella pallida</i>	Gorrión pálido	2
		<i>Chondestes grammacus</i>	Gorrión arlequin	1
		<i>Passerculus sandwichensis</i>	Gorrión sabanero	1
		<i>Melospiza lincolni</i>	Gorrión Lincoln	2
		<i>Zonotrichia leucophrys</i>	Gorrión corona blanca	2
		<i>Arremonops rufivirgatus</i>	Rascador oliváceo	2
	Cardinalidae	<i>Cardinalis cardinalis</i>	Cardenal rojo	1,2
		<i>Cardinalis sinuatus</i>	Cardenal pardo	2
		<i>Pheucticus melanocephalus</i>	Picogordo tigrillo	3
		<i>Passerina cyanea</i>	Colorin azul	2
	Icteridae	<i>Sturnella neglecta</i>	Pradero occidental	1
		<i>Icterus cucullatus</i>	Bolsero encapuchado	1
Fringillidae	<i>Carduelis psaltria</i>	Jilguero dominico	3	
Passeridae	<i>Passer domesticus</i>	Gorrión casero	1,2	

De las 90 aves que fueron seropositivas por ELISA para WNV, 58 (64.44%) fueron residentes y 32 (35.55%) fueron migratorias (Tabla VII, Figura 7). Por Estados los resultados fueron: Tamaulipas 30 (76.92%) residentes y 9 (23.07%) migratorias, además las especies residentes *Mimus polyglottos* y *Cardinalis cardinalis* fueron de las seropositivas las de mayor numero: n= 8 y 5 respectivamente (Tabla VIII). Para Nuevo León 24 (56.09%) y 19 (43.90%) donde las especies seropositivas con mayor numero fueron como residentes *Cardinalis cardinalis*, *C. sinuatus*, y *Melanerpes aurifrons*, con una n= 4 ejemplares cada uno y la especie migratoria positiva con mayor frecuencia fue *Sayornis phoebe* con una n= 3 ejemplares (Tabla IX). Para Coahuila n= 4 (50%) tanto para residentes como migratorios (Tabla X).

TABLA VII

Número y porcentaje de aves residentes y migratorias seropositivas por estado

Estado	Residentes: No. y %	Migratorias: No. y %
<b>Tamaulipas</b>	30 (76.92%)	9 (23.07%)
<b>Nuevo León</b>	24 (56.09%)	19 (43.90%),
<b>Coahuila</b>	4 (50%)	4 (50%)
Total	58 (64.44%)	32 (35.55%)

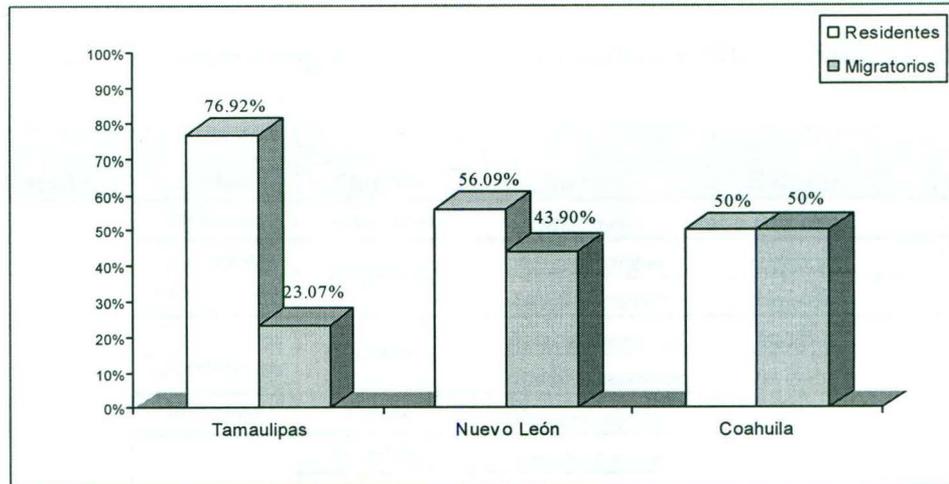


Figura 7. Porcentaje de aves residentes/migratorias seropositivas por estado.

TABLA VIII

Relación de aves residentes/migratorias seropositivas para WNV en Tamaulipas

Estado	Orden	Familia	Genero	Estatus	n =	
Tamaulipas	Columbiformes	Columbidae	<i>Zenaida macroura</i>	residente	1	
			<i>Columbina passerina</i>	residente	3	
	Cuculiformes	Cuculidae	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	residente	1	
	Piciformes	Picidae	<i>Melanerpes aurifrons</i>	residente	1	
	Passeriformes	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	residente	1	
			<i>Sayornis phoebe</i>	migratorio	2	
			<i>Tyrannus melancholicus</i>	residente	1	
		Laniidae	<i>Lanius ludovicianus</i>	residente	1	
		Vireonidae	<i>Vireo griseus</i>	residente	1	
		Corvidae	<i>Cyanocorax yncas</i>	residente	1	
		Troglodytidae	<i>Troglodytes aedon</i>	migratorio	1	
		Mimidae	<i>Mimus polyglottos</i>	residente	8	
			<i>Toxostoma longirostre</i>	residente	2	
			<i>Toxostoma curvirostre</i>	residente	1	
			Parulidae	<i>Icteria virens</i>	migratorio	2
			Emberizidae	<i>Chondestes grammacus</i>	migratorio	1
				<i>Passerculus sandwichensis</i>	migratorio	2
			Cardinalidae	<i>Cardinalis cardinalis</i>	residente	5
			Icteridae	<i>Sturnella neglecta</i>	migratorio	1
	<i>Icterus cucullatus</i>	residente		2		
Passeridae	<i>Passer domesticus</i>	residente	1			

TABLA IX

Relación de aves residentes/migratorias seropositivas para WNV en Nuevo León

Estado	Orden	Familia	Genero	Estatus	n =	
Nuevo León	Galliformes	Phasianidae	<i>Gallus gallus</i>	residente	1	
	Falconiformes	Accipitridae	<i>Accipiter striatus</i>	migratorio	1	
	Falconiformes		<i>Accipiter cooperii</i>	migratorio	1	
	Columbiformes	Columbidae	<i>Zenaida macroura</i>	residente	2	
	Columbiformes		<i>Columbina passerina</i>	residente	1	
	Piciformes	Picidae	<i>Melanerpes aurifrons</i>	residente	4	
	Passeriformes	Tyrannidae		<i>Sayornis phoebe</i>	migratorio	4
		Vireonidae		<i>Vireo atricapillus</i>	residente	1
		Paridae		<i>Baeolophus bicolor</i>	migratorio	2
		Mimidae		<i>Mimus polyglottos</i>	residente	2
				<i>Toxostoma longirostre</i>	residente	1
		Parulidae		<i>Dendroica coronata</i>	migratorio	1
				<i>Mniotilta varia</i>	migratorio	3
				<i>Wilsonia pusilla</i>	migratorio	2
		Emberizidae		<i>Arremonops rufivirgatus</i>	residente	1
				<i>Spizella pallida</i>	migratorio	1
				<i>Melospiza lincolni</i>	migratorio	1
				<i>Zonotrichia leucophrys</i>	migratorio	1
		Cardinalidae		<i>Passerina cyanea</i>	migratorio	2
				<i>Cardinalis cardinalis</i>	residente	4
	<i>Cardinalis sinuatus</i>		residente	4		
Passeridae		<i>Passer domesticus</i>	residente	3		

Tabla X

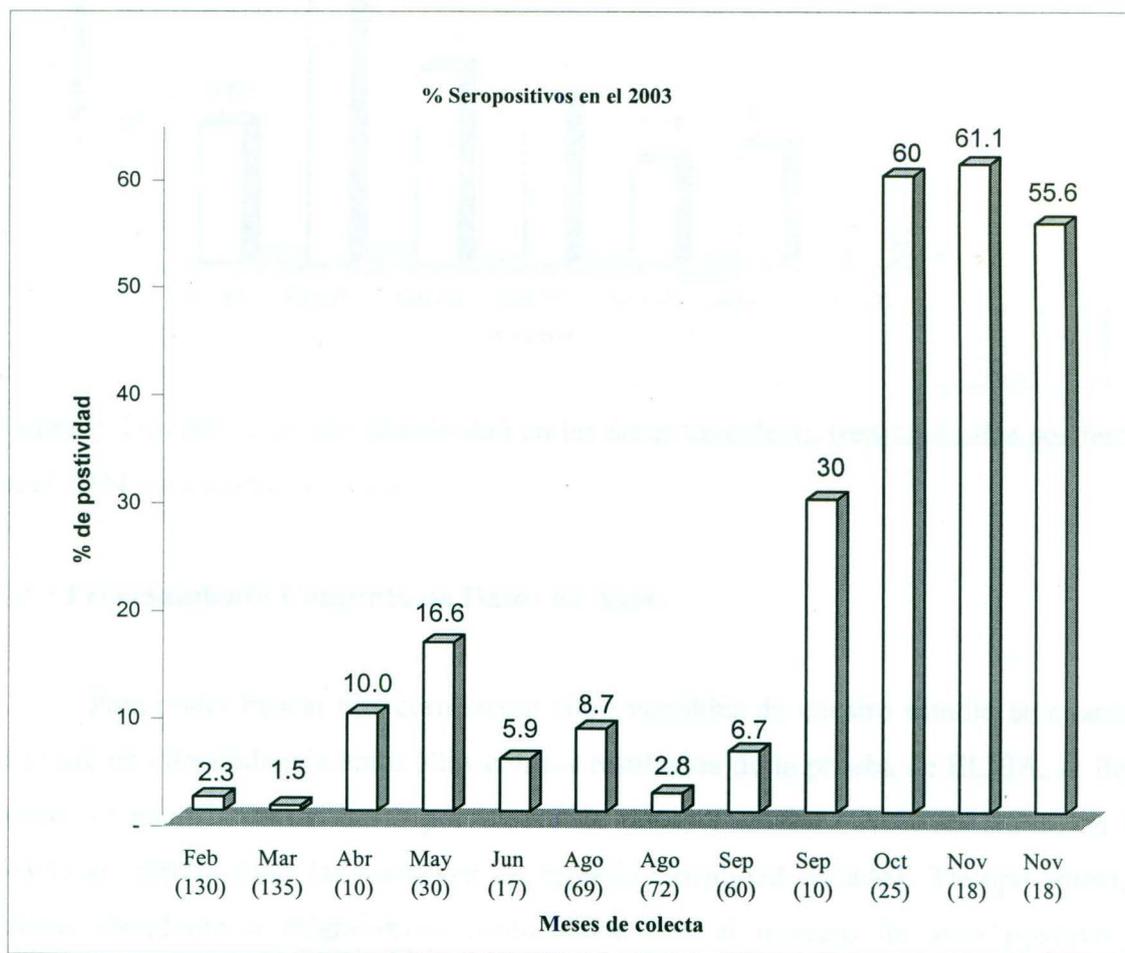
Relación de aves residentes/migratorias seropositivas para WNV Coahuila.

Estado	Orden	Familia	Genero	Estatus	n =	
Coahuila	Columbiformes	Columbidae	<i>Zenaida macroura</i>	residente	1	
	Strigiformes	Strigidae	<i>Micrathene withneyi</i>	residente	1	
	Passeriformes	Paridae		<i>Baeolophus bicolor</i>	migratorio	2
		Turdidae		<i>Sialia mexicana</i>	residente	1
				<i>Catharus guttatus</i>	migratorio	1
		Cardinalidae		<i>Pheucticus melanocephalus</i>	residente	1
		Fringillidae		<i>Carduelis psaltria</i>	migratorio	1

En el año 2003 y los primeros meses del 2004 fue donde se encontraron aves positivas, las cuales corresponden a las localidades del Rancho el Carrizal en el municipio de Matamoros, 20/Mar/03 (2 positivos de 135 representando 1.38% seropositividad), Rancho de la Fuente en el Municipio de San Fernando, 30/Ago/03 (2 Positivos de 72 con un 2.77% de seropositividad), La Pesca en la primer colecta el 13/Sep/03 (4 positivos de 60 con 6.66% de seropositividad) la segunda colecta se llevo acabo el 21/Nov/03 (10 positivos de 18 con un 55.55% de seropositividad), Presa Falcón en el Municipio de Nuevo Guerrero el 14/Nov/03 (11 positivos de 18 con un 61.10% de seropositividad), Rancho Las Carreras en San Fernando 30/Ene/04 (10 positivas de 105 con un 9.52% de seropositividad); todas estas localidades pertenecientes al estado de Tamaulipas (Figuras 8, 9).

Para el Estado de Nuevo León se obtuvieron 10 localidades positivas del 2003 al 2004 las cuales fueron: Rancho Santa Maria en Lampazos 13/Feb/03 (3 positivos de 130 representando un 2.30% de seropositividad, Ejido Francisco Villa en el municipio de Pesquería 3/Abr/03 (1 positivo de 10, representando un 10% de seropositividad) la segunda colecta en esta localidad fue el 3/Jun/03 (1 positivo de 17 representando un 5.88% de seropositividad), Nueva Castilla en el Municipio de Escobedo el 20/Ago/03 (6 Positivos de 69 colectados, representando un 8.69% de seropositividad) la segunda colecta en esta localidad fue el 15/Abr/04 (1 positivo de 12 colectados representando un 8.33% de seropositividad.), Presa Sombrerillos en el Municipio de Sabinas Hidalgo el 23/Oct/03 (15 positivos de 25 colectados, representando un 60 % de seropositividad), Municipio El Carmen el 18/Mar/04 (11 positivos de 43 colectados, representando un 25.58% de seropositividad), Municipio de Apodaca el 13/Abr/04 (2 positivos de 15 colectados, representando un 13.33 % de seropositividad), Río San Juan en el municipio de Cadereyta el 13/Abr/04 (1 positivos de 9 colectados, representando un 11.11% de seropositividad), El Barreal en el Municipio de Santiago el 13/Abr/04 (1 positivos de 14 colectados, representando un 7.14% de seropositividad), y en la localidad de la UDEM en el Municipio de San Pedro el 13/Abr/04 (1 positivos de 7 colectados, representando un 14.28% de seropositividad) (Figuras 8, 9).

Para el Estado de Coahuila solo en dos localidades fueron encontradas aves positivas, La Escondida en el Municipio de Muzquiz el 6/May/03 (5 positivos de 30 colectados, representando un 16.60% de seropositividad), y en la localidad del rancho La Casita en el Municipio de Morelos el 27/Sep/03 (3 positivos de 10 colectados, representando un 30% de seropositividad) (Figuras 8, 9).



\*El % de seropositividad se obtuvo del total de aves colectadas por localidad

Figura 8. Porcentaje de seropositividad en las áreas de colecta (representadas por fecha) en el 2003 para los tres estados.

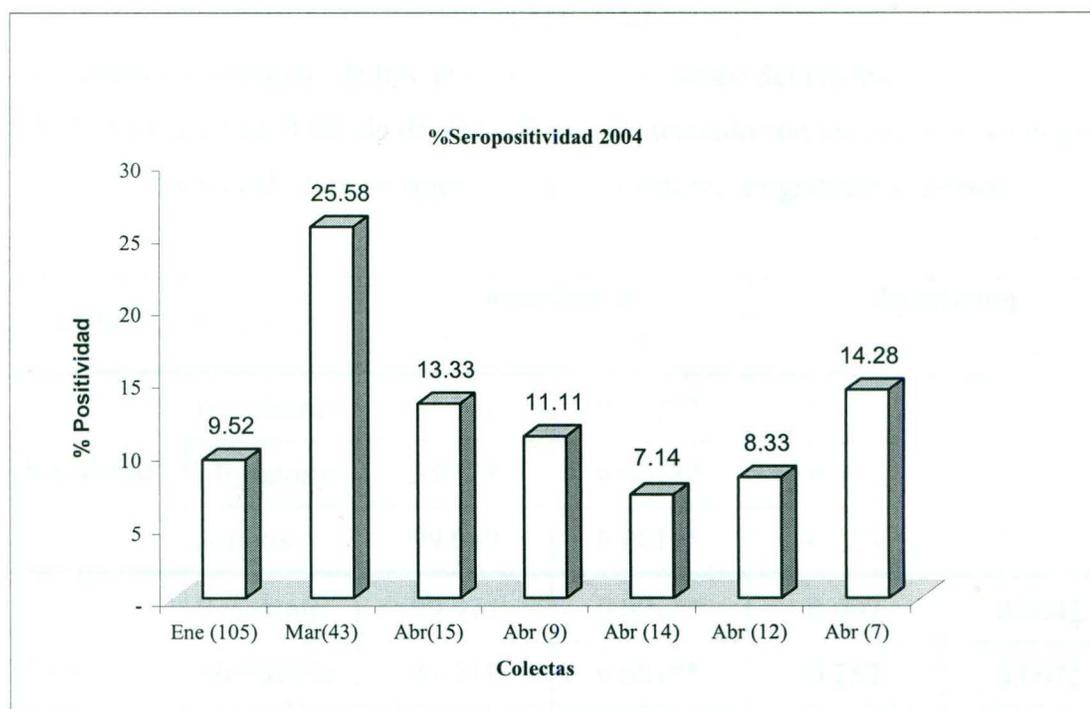


Figura 9. Porcentaje de seropositividad en las áreas de colecta (representadas por fecha) en el 2004 para los tres estados

### 7.2.3 Procesamiento Conjunto de Datos de Aves.

Para poder buscar una correlación entre variables de nuestro estudio en cuanto a si existe una dependencia entre ellas con los resultados de la prueba de ELISA, se llevo acabo el análisis de los datos por medio de tablas cruzadas (Crosstabulation) en las cuales se correlaciono las variables de espacio (localidad, estado), Tiempo (mes), y estatus (residente o migratorios) contrastados con el número de aves positivos y negativos por la técnica de ELISA. Para el estado de Tamaulipas, se encontró dependencia altamente significativa a las variables de localidades y mes de colecta, al contrastarlos con el número total de aves (residentes y migratorios) positivos y negativos, obteniendo valores de  $X^2$  de 99.949 y 124.074, respectivamente con una  $p < 0.001$  con una dependencia y asociación altamente significativa; también encontrando que las aves migratorias al contrastarlas con las localidades se obtuvo una  $X^2$  de 35.523 con una  $p < 0.001$  que fue la variable que tubo mayor asociación y dependencia significativa (Tabla XI, Figuras 10 y 11).

TABLA XI

Parámetros del análisis de frecuencias (tablas cruzadas) del resultado de la prueba de ELISA en aves en el estado de Tamaulipas, contrastado con las variables de espacio (localidad), tiempo (mes), y status (residente, migratorio y ambos)

Variables	Status	Dependencia		Asociación	
		X <sup>2</sup>	P<	r	p
Localidad	Residente	71.562	0.001**	0.192	0.001‡
	Migratorio	35.523	0.001**	0.344	0.001‡
	Ambos	99.949	0.001**	0.224	0.001‡
Mes	Residente	99.973	0.001**	0.097	0.004‡
	Migratorio	33.111	0.001**	0.253	0.001‡
	Ambos	124.074	0.001**	0.132	0.001‡

\*\* = dependencia altamente significativa, ‡ = asociación altamente significativa.

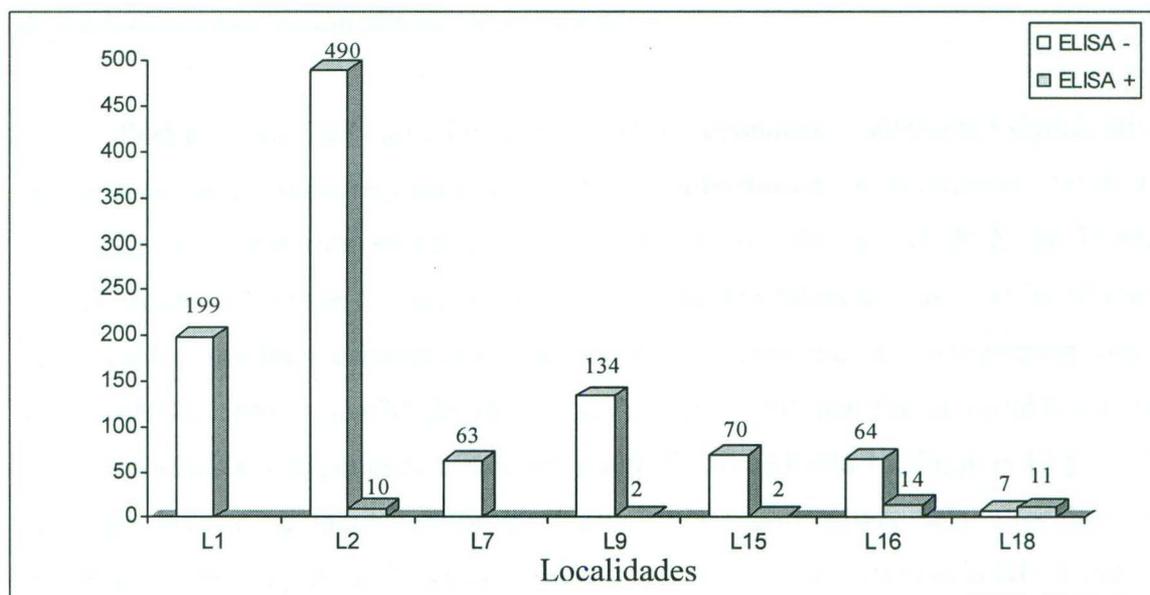
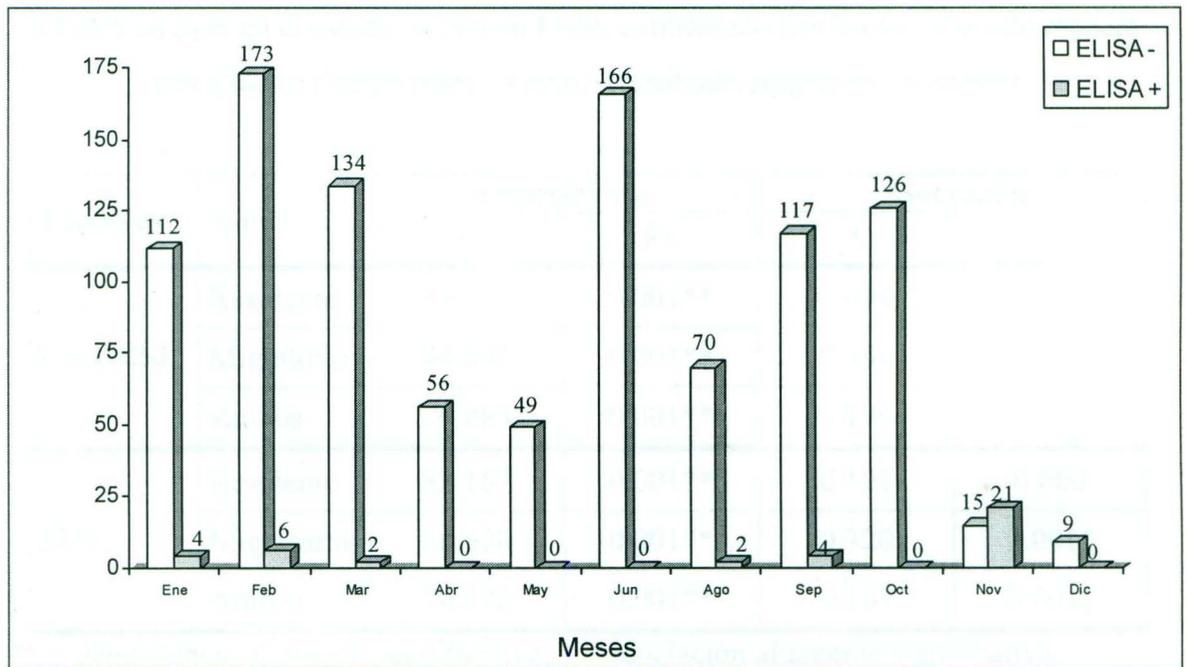


Figura 10. Número de aves colectadas contrastadas con las localidades de de colecta en Tamaulipas. La X<sup>2</sup> fue de 99.949 con una p< 0.001 mostrando dependencia y asociación altamente significativa.



**Figura 11.** Número de aves colectadas positivas y negativas contrastadas con los meses de colecta en Tamaulipas. La  $X^2$  fue de 124.074 con una  $p < 0.001$  mostrando dependencia y asociación altamente significativa.

Para el estado de Nuevo León, se encontró dependencia altamente significativa a las variables de localidades y mes de colecta, al contrastarlos con el número total de aves (residentes y migratorias) positivas y negativas, obteniendo valores de  $X^2$  de 79.883 y 70.370, respectivamente con una  $p < 0.001$  con una dependencia y asociación altamente significativa; también encontrando que las aves migratorias al contrastarlas con las localidades se obtuvo una  $X^2$  de 44.807 con una  $p < 0.001$  que fue la variable que tubo mayor asociación y dependencia altamente significativa (Tabla 12, Figuras 12 y 13). Sin embargo, las aves residentes no presentó asociación significativa, para la localidad ( $r = 0.094$ ,  $p = 0.077$ ) y para el mes de colecta ( $r = 0.101$ ,  $p = 0.060$ ) (Tabla XII, Figuras 12 y 13).

TABLA XII

Parámetros del análisis de frecuencias (tablas cruzadas) del resultado de la prueba de ELISA en aves en el estado de Nuevo León, contrastado con las variables de espacio (localidad), tiempo (mes), y status (residente, migratorio y ambos)

Variables	Status	Dependencia		Asociación	
		X <sup>2</sup>	P<	r	p
Localidad	Residente	35.781	0.001**	0.094	0.077
	Migratorio	44.807	0.001**	0.386	0.001‡
	Ambos	79.883	0.001**	0.196	0.001‡
Mes	Residente	33.167	0.001**	0.101	0.060
	Migratorio	36.670	0.001**	0.320	0.001‡
	Ambos	70.370	0.001**	0.167	0.001‡

\*\* = dependencia altamente significativa, ‡ = asociación altamente significativa.

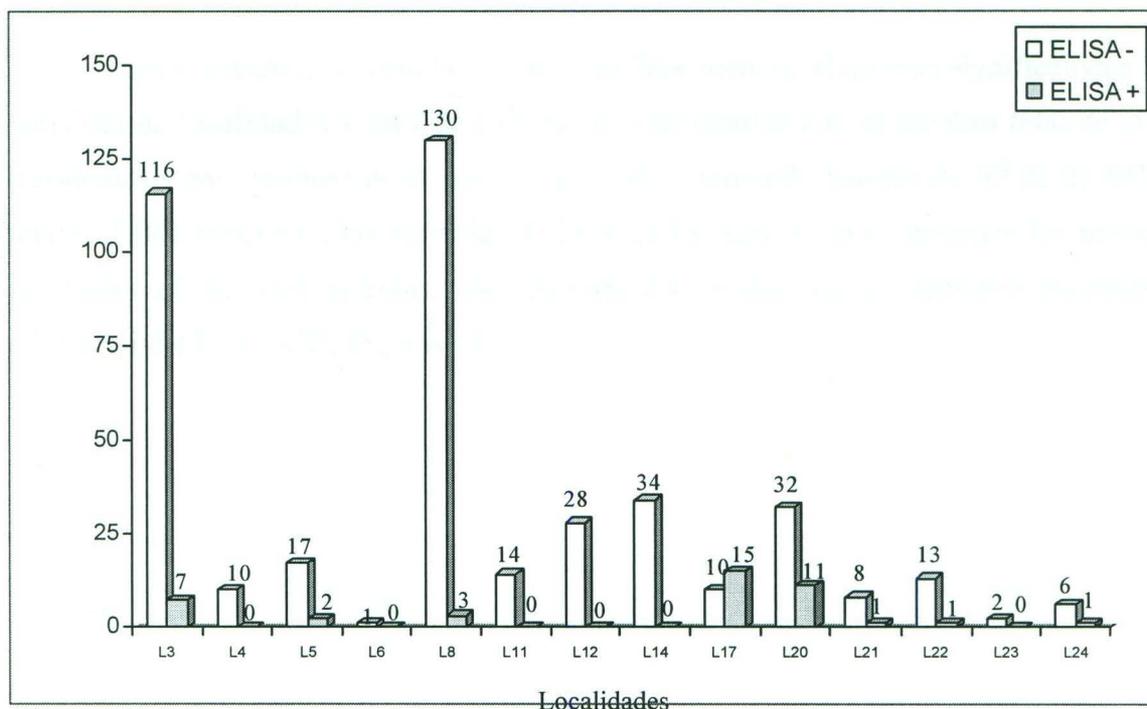


Figura 12. Número de aves colectadas positivas y negativas contrastadas con las localidades de de colecta en Nuevo León. La X<sup>2</sup> fue de 79.883 con una p< 0.001 mostrando dependencia y asociación altamente significativa.

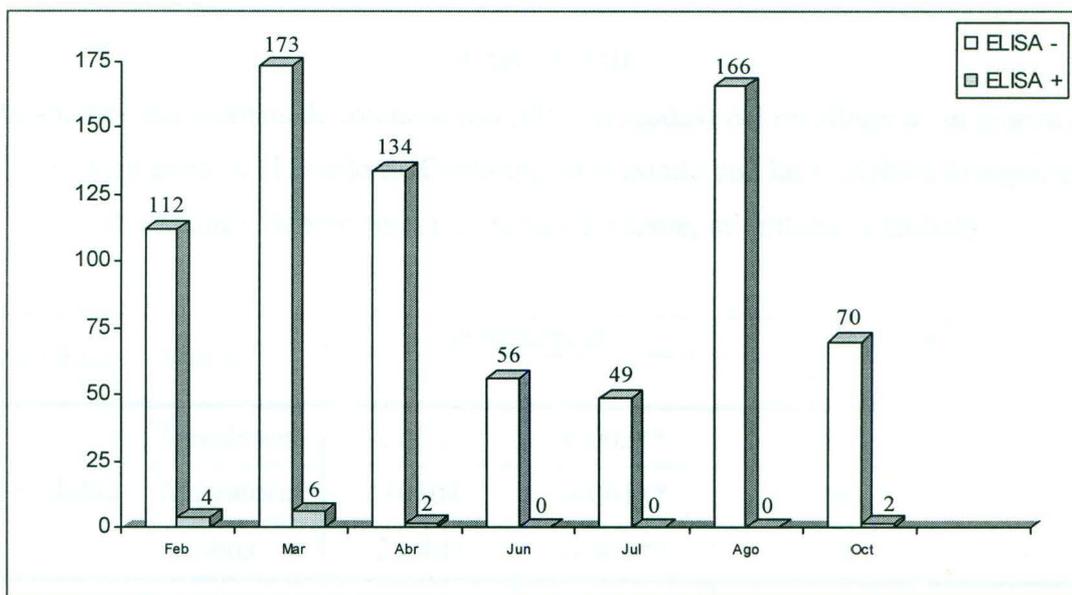


Figura 13. Número de aves colectadas positivas y negativas contrastadas con los meses de colecta en Nuevo León. La  $X^2$  fue de 70.370 con una  $p < 0.001$  mostrando dependencia y asociación altamente significativa.

Para el estado de Coahuila, se encontró dependencia altamente significativa a las variables de localidades y mes de colecta, al contrastarlos con el número total de aves (residentes y migratorios) positivos y negativos, obteniendo valores de  $X^2$  de 21.483 y una  $p < 0.001$  tanto para las variables de localidad y mes, ya que contienen los mismos resultados en las tres colectas, además para este estado no se encontró asociación significativa (Tabla XIII, Figuras 14).

TABLA XIII

Parámetros del análisis de frecuencias (tablas cruzadas) del resultado de la prueba de ELISA en aves en el estado de Coahuila, contrastado con las variables de espacio (localidad), tiempo (mes), y status (residente, migratorio y ambos).

Variables	Status	Dependencia		Asociación	
		X <sup>2</sup>	p	r	p
Localidad	Residente	11.315	0.003**	-0.183	0.095
	Migratorio	10.304	0.001**	0.048	0.728
	Ambos	21.483	0.001**	-0.073	0.392
Mes	Residente	11.315	0.003**	-0.183	0.095
	Migratorio	10.304	0.001**	0.048	0.728
	Ambos	21.483	0.001**	0.073	0.392

\*\* = dependencia altamente significativa, ‡ = asociación altamente significativa.

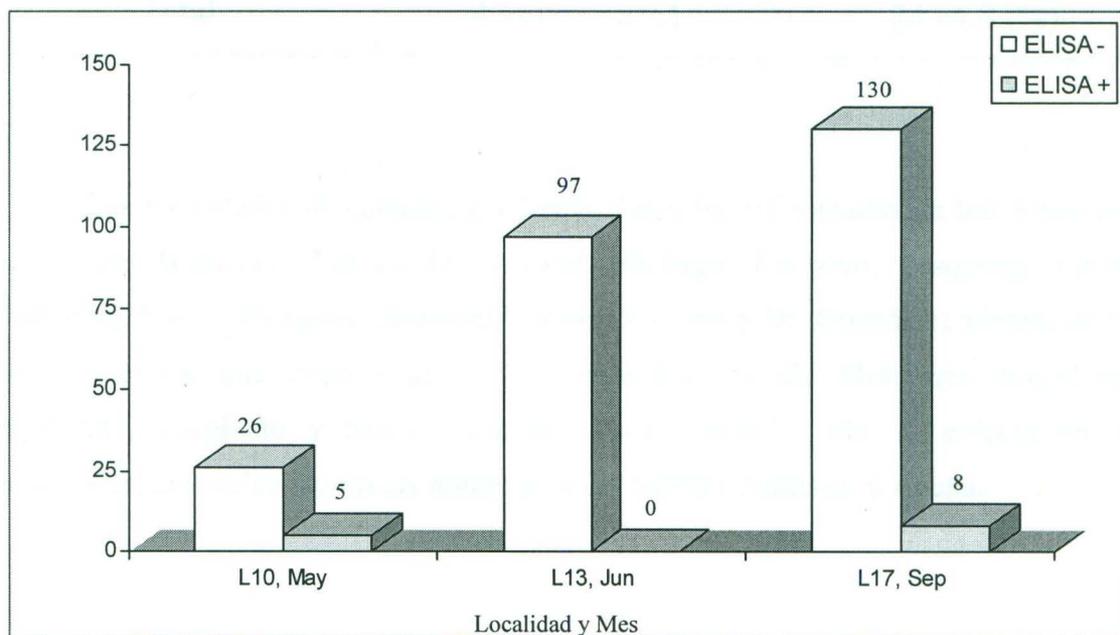


Figura 14. Número de aves colectadas contrastadas con las localidades y los meses de colecta en Tamaulipas. La X<sup>2</sup> fue de 21.483 con una p < 0.001.

### 7.3 Muestreo en caballos

Se llevaron a cabo un total de 39 colectas de suero de caballos en los estados de Nuevo León y Coahuila, durante el periodo: Diciembre del 2002 a Mayo del 2004. Se tomaron muestras de sangre de un total de 498 caballos (474, 95.18%) para Nuevo León, y 24 (4.81%) para Coahuila (Tabla XIV).

TABLA XIV

Total de muestras de suero de equinos colectados en los Estados de Nuevo León y Coahuila, de Diciembre del 2002 a Mayo del 2004

<b>Año</b>	<b>Nuevo León</b>	<b>Coahuila</b>
2002	0	24 (4.81%)
2003	406 (81.52%)	0
2004	68 (13.65%)	0
<b>Total</b>	<b>474 (95.18%)</b>	<b>24 (4.81%)</b>

Las localidades de colecta para Nuevo León fueron tomadas de los municipios rurales de: Higuera, Zuazua, Dr. Arroyo, Santiago, Cerralvo, Pesquería, Linares, Cadereyta, Juárez, Zaragoza, Aramberri, Slinas Victoria y Dr. González; además de 4 de los municipios que conforman el área metropolitana de Monterrey (Guadalupe, Monterrey, Escobedo y Santa Catarina). Para Coahuila solo se colectó en tres localidades, las cuales fueron los municipios de Saltillo, Jiménez, y Acuña.

### 7.3.1 Caballos seropositivos

De los 498 caballos muestreados, 116 (23.29%) resultaron seropositivos para la prueba de ELISA de bloqueo para detección de anticuerpos neutralizantes contra flavivirus, 100 en Nuevo León y 16 en el estado de Coahuila de Diciembre del 2002-Mayo del 2004 en 31 de las localidades (Tabla XV y XVI).

TABLA XV

Total de muestras de suero de equinos colectados en los Estados de Nuevo León y Coahuila, de Diciembre del 2002-Mayo del 2004 positivos por ELISA a WNV y su porcentaje de seropositividad por año

<b>Año</b>	<b>Nuevo León</b>	<b>Coahuila</b>
2002	0	16 (66.66%)
2003	60 (14.77%)	0
2004	40 (58.82%)	0
Total Positivos.	100	16

\*Los porcentajes de positividad son por año y no por colecta.

TABLA XVI

Localidades con muestras seropositivas y número de positivos

Estado	Localidad	Fecha.	Seropositivos
Coahuila	Cd. Acuña	Dic/02	11
	Jiménez.		4
	Saltillo		1
Nuevo León	Rancho El Agarron, Higueras.	25/Feb/03	6
	Policia Montada, Gpe.	11/Mar/03	1
	Granja La Palma, Zuazua.	18/Mar/03	5
	Policia Montada, Gpe.	20/Mar/03	1
	Sabinal	04/Abr/03	5
	Fco. Villa		12
	Paseo de los Mirtos, N.C., Escobedo.	22/Abr/03	1
	Ej. La Ascensión, Aramberri.		1
	Ej. El Diez, linares.	29-Abr/03	2
	Ej. El Mezcal, Dr. Arroyo.	15/May/03	1
	Rancho Las Espuelas, Zuazua.	04/Jun/03	14
	Zaragoza.		1
	Ej. La Ascensión, Aramberri.		1
	Monterrey	11/Jun/03	1
	Escobedo.		2
	Guadalupe.		7
	Ej. Juárez, Juárez.		3
	El Yerbaniz, Santiago.		8
	Cola De Caballo, Santiago.		1
	Los Cabazos, Santiago.		3
	Lienzo Charro, Zuazua.		5
	Rancho Cañamar, Zuazua.		3
	Rancho San José, Zuazua.		5
	Treviño/Francisco V, Zuazua.		2
	Marín		1
	Dr. González		5
	C. Miguel Alemán, Km., 49, Dr. González.		4
Pesquería	3		

Las tres localidades en las que se colectó suero de caballos en el estado de Coahuila en el en Diciembre del 2002, resultaron positivas a la prueba de ELISA en busca de WNV, encontrándose un 78.57%, 80% y 100% de seropositividad para los municipios de Ciudad Acuña, Jiménez y Saltillo respectivamente (Figura 15).

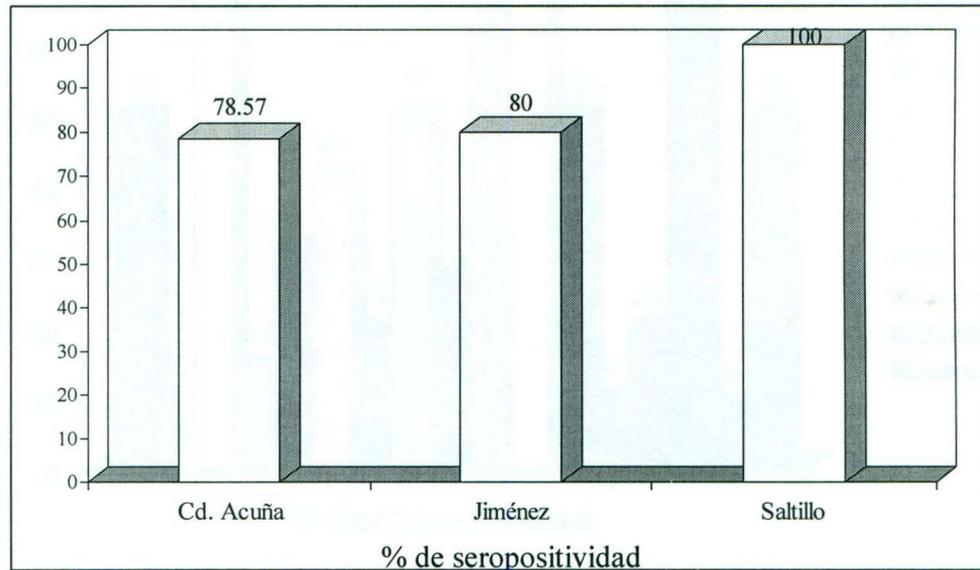


Figura 15. Porcentaje de seropositividad en Coahuila en el 2002 en los tres municipios de colecta.

Para el estado de Nuevo León se encontraron sueros seropositivos a WNV por medio de la prueba de ELISA en 16 de los 17 municipios en que se colectó, de los meses de Febrero a Julio del 2003 (Figura 15) (Anexo 4).

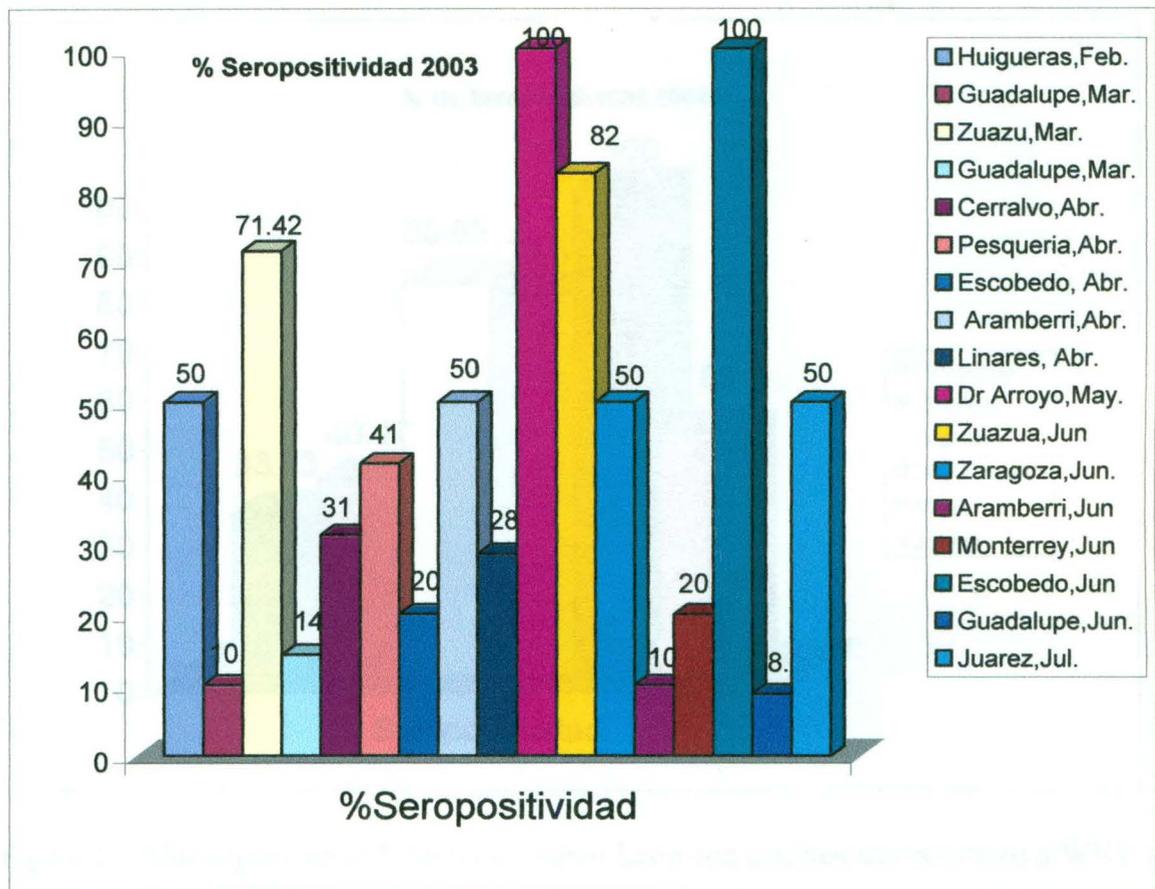


Figura 16. Municipios de Nuevo León con caballos seropositivos a WNV en colectas realizadas de Febrero a Julio en el 2003 y su porcentaje de seropositividad por colecta.

En el 2004 en el estado de Nuevo León solo se colecto en el mes de Mayo en seis municipios: Pesquería, Santiago, Juárez, Dr. González, Zuazua y Marín con 33.33%, 40.47%, 50%, 78.57%, 80.65% y 100% de seropositividad respectivamente (Figura 16, 17, y 18).

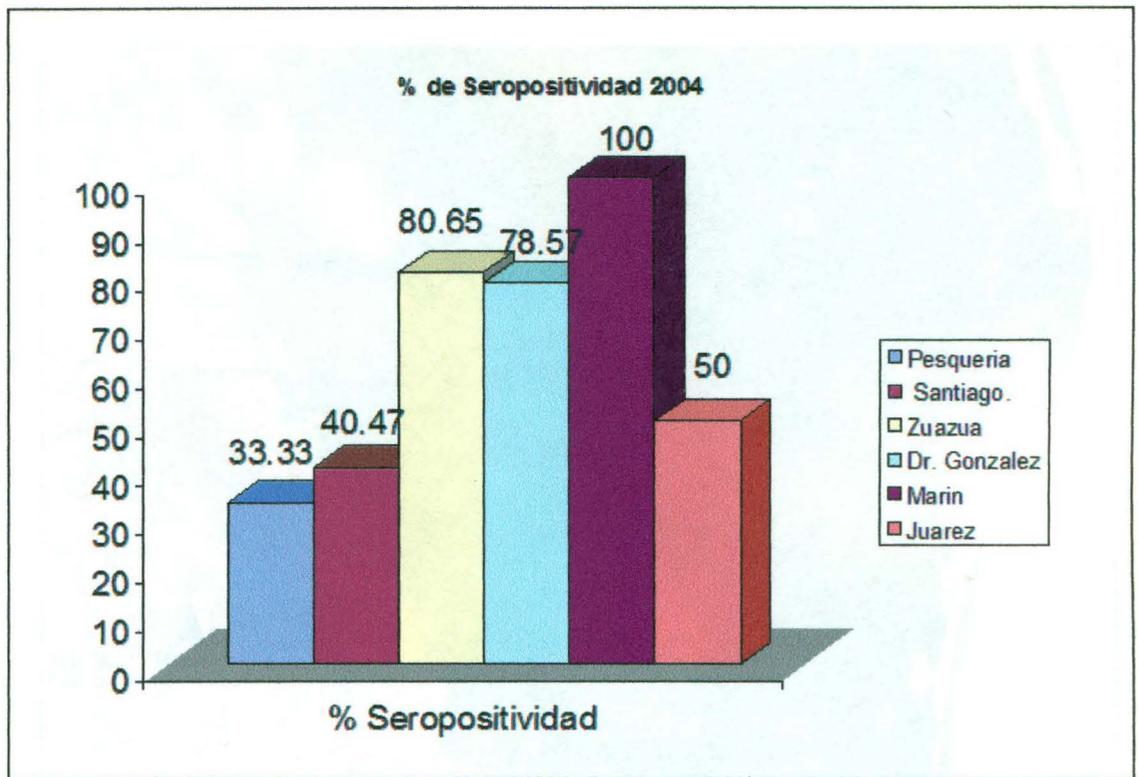


Figura 17. Municipios en el Estado de Nuevo León con equinos seropositivos a WNV y porcentaje de seropositividad por localidad.

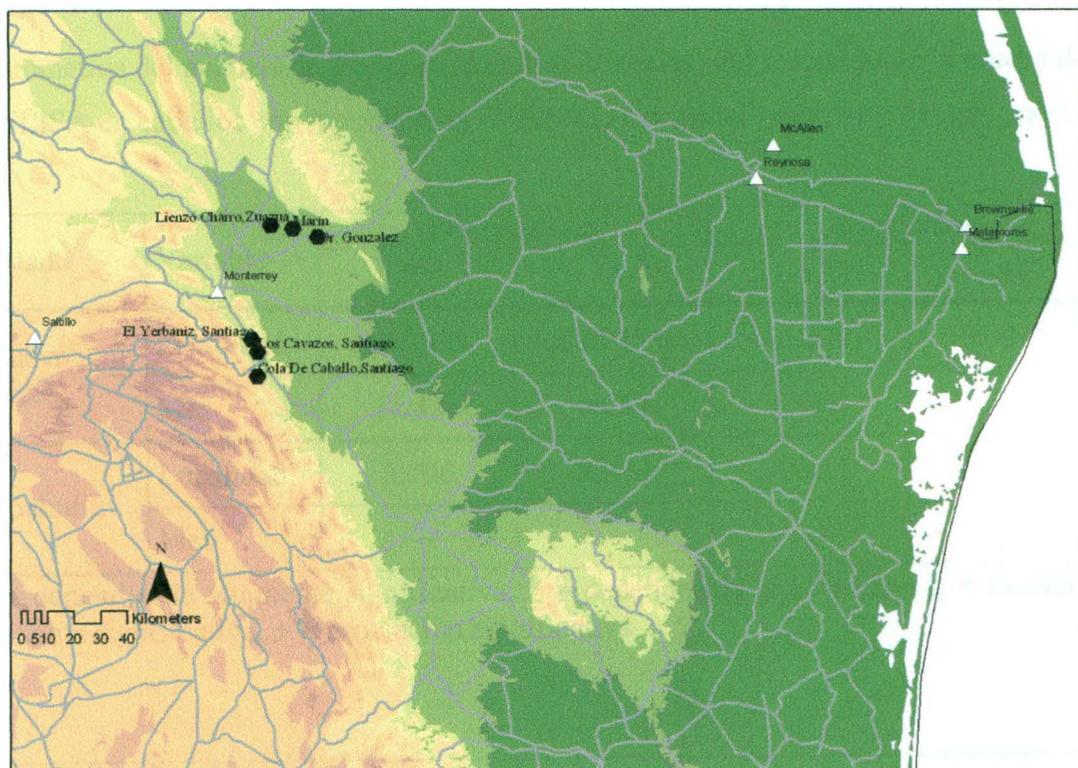


Figura 18. Mapa resaltando los sitios de colecta de equinos para el 2004 en el estado de Nuevo León, en donde todos tuvieron caballos positivos.

### 7.3.2 Procesamiento conjunto de datos de equinos

Para la dependencia entre las variables de equinos las cuales fueron de espacio (localidad, estado), Tiempo (mes), en cuanto a si existe dependencia entre ellas con los resultados de la prueba de ELISA, al ser analizados estos datos por medio de tablas cruzadas (Crosstabulation), (Tabla 17), se encontró para el estado de Nuevo León una  $X^2$  de 142.979 con una  $p < 0.001$  (altamente significativa) para la variable de localidad, así como correlación altamente significativa ( $r = -0.274$ ,  $p < 0.001$ ) y una  $X^2$  de 11.426 con una probabilidad de 0.044 (significativa) y una asociación de 0.060 no significativa en la variable de mes. Para el estado de Coahuila (tres localidades) la variable de localidad tuvo una  $X^2$  de 5.996 con una probabilidad de 0.050 y una correlación de -0.411 significativa (Figuras 19,20 y 21).

TABLA XVII

Parámetros del análisis de frecuencias (tablas cruzadas) del resultado de la prueba de ELISA en caballos con las variables de espacio (localidad, estado) y tiempo (mes)

Estado	Variable	Dependencia		Asociación	
		X <sup>2</sup>	P	r	p
Nuevo León	Localidad	142.979	0.001**	-0.274	0.001‡
	Mes	11.426	0.044	0.060	0.209
Coahuila	Localidad	5.996	0.050	-0.411	0.046+
	Mes	---	---	---	---

\*\* = dependencia altamente significativa, \* = dependencia significativa ‡ = asociación altamente significativa, + = asociación significativa

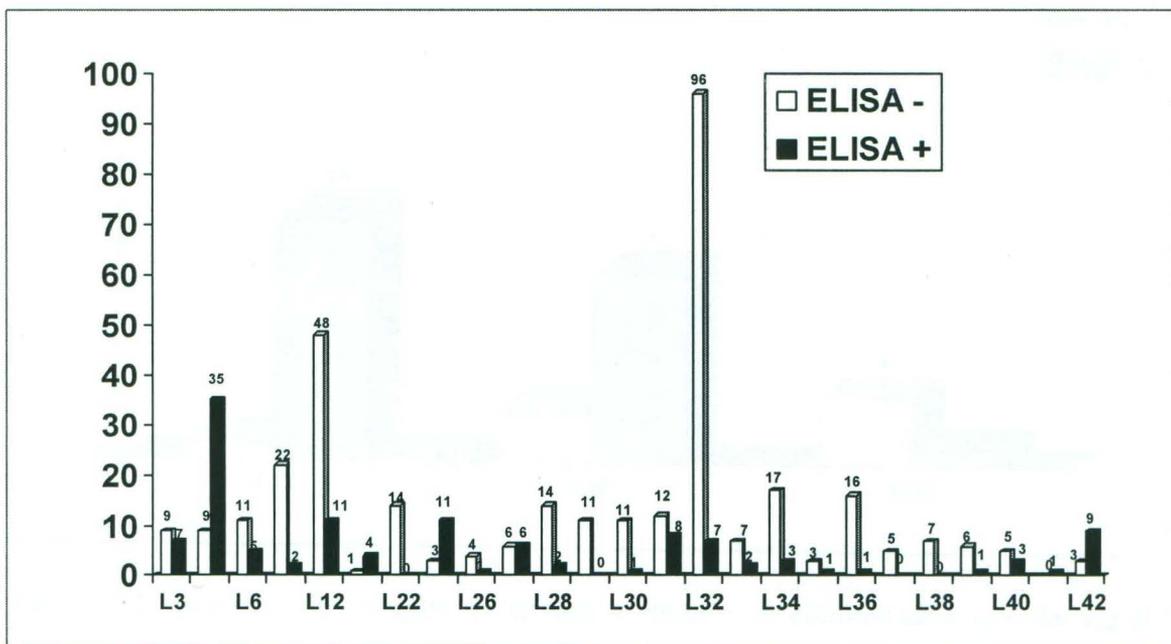


Figura 19. Numero de caballos positivos y negativos contrastados con la variable de la localidad para Nuevo León. La X<sup>2</sup> fue de 142.979 con una p < 0.001.

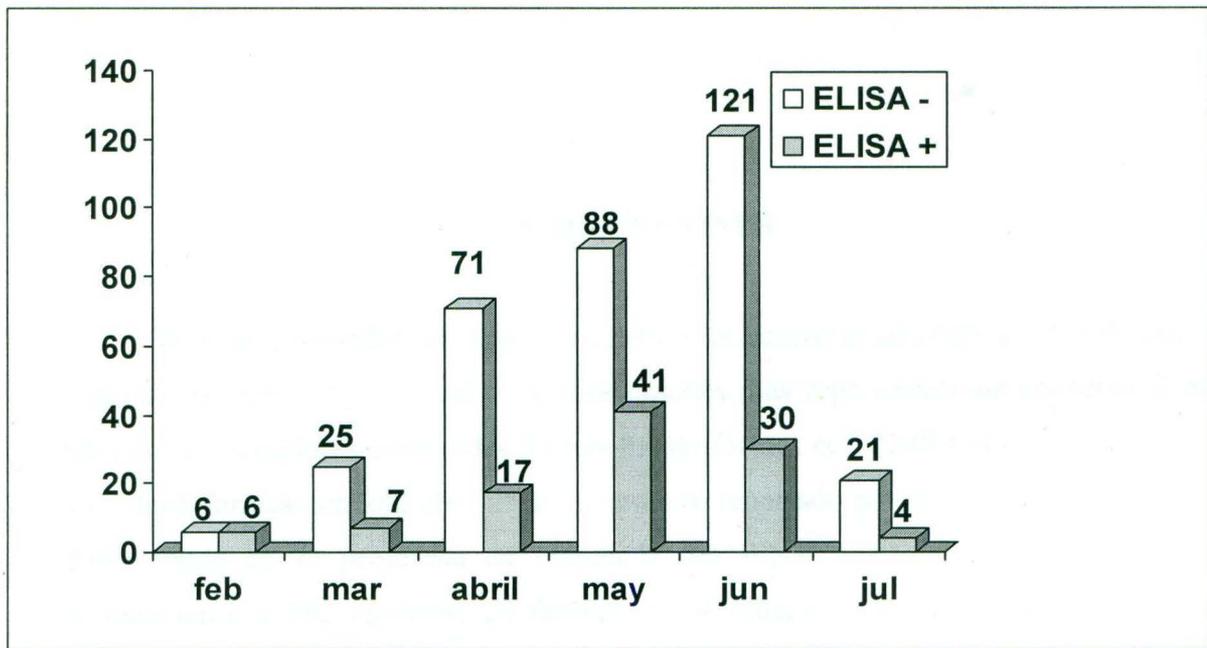


Figura 20. Numero de caballos positivos y negativos contrastados con la variable meses de estudio para Nuevo León. La  $X^2$  fue de 11.426 con una probabilidad de 0.044.

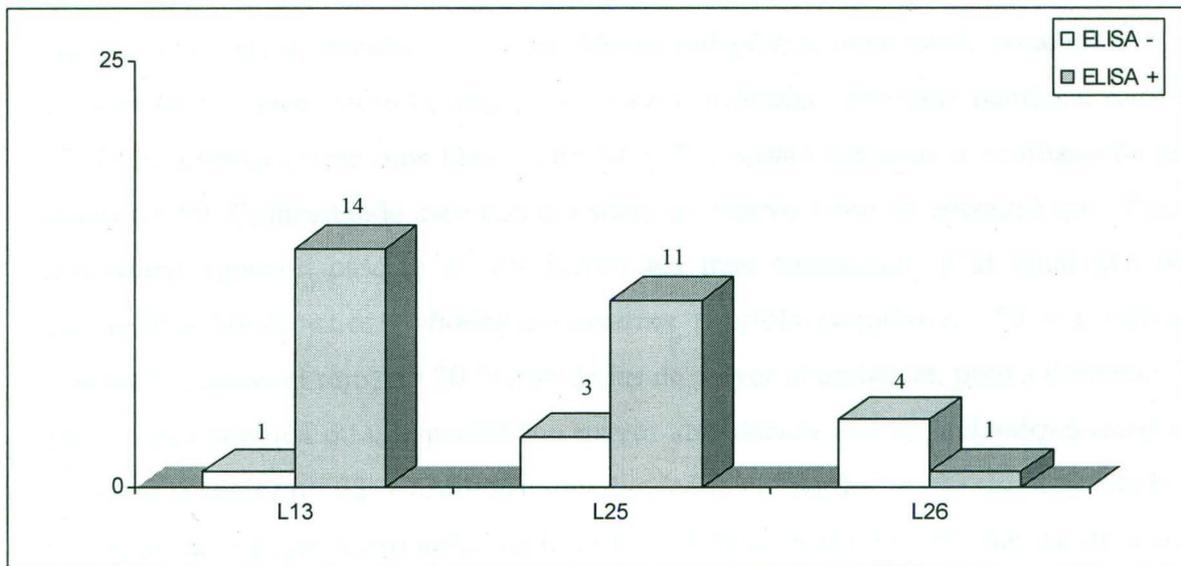


Figura 21. Numero de caballos positivos y negativos contrastados con la variable localidad para Coahuila. La  $X^2$  fue de 5.996 con una probabilidad de 0.050.

## 8. DISCUSIONES

Fueron colectadas un total de 1,686 aves, correspondiendo a 13 órdenes, 38 familias, 86 géneros y 123 especies. Los ordenes mas representativos por tener mayor número de ejemplares capturados fueron Passeriformes con 1248 (74.02%) ejemplares, y Columbiformes con 282 (16.72%), tal como lo reportado por el grupo de Farfan en el 2004 donde en su programa de vigilancia del WNV del total de aves capturadas pertenecieron a 182 especies, 28 familias y 14 ordenes. Así mismo los ordenes con mayor frecuencia de captura fueron Passeriformes con 7270 (84.34%), y Columbiformes con 907 (10.53) (Farfan *et al.* 2004), esto coincidiendo con el presente análisis.

En el estado de Tamaulipas fueron colectadas 1,070 (63.46%) aves, y las especies con mayor abundancia fueron: *Mimus polyglottos* (centzontle norteño) n= 153, *Columbina passerina* (tórtola coquita) n= 149, *Cardinalis cardinalis* (cardenal rojo) n= 67, *Vireo griseus* (vireo ojos blancos) n= 61 y *Toxostoma longirostre* (cuitlacoche pico largo) n= 59. Contrastando esto con el estado de Nuevo León se encontró que *Passer domesticus* (gorrión casero) n= 65 fueron los mas colectados, y al igual que para Tamaulipas las especies *Columbina passerina* (Tórtola coquita) n= 53 y *Cardinalis cardinalis* (cardenal rojo) n= 20 fueron de las de mayor abundancia, pero a diferencia de Tamaulipas también otras especies con mayor abundancia fueron *Melanerpes aurifrons* (carpintero cheje) n= 32, *Cardinalis sinuatus* (cardenal pardo) n= 23. Para el estado de Coahuila la especie *Cardinalis cardinalis* (cardenal rojo) n= 16 fue la de mayor abundancia concordando con los otros dos estados, además de *Myiarchus cinerascens* (papamoscas cenizo) n= 13, *Passerina caerulea* (picogordo azul) n= 9, y *Passerina ciris* (colorin sietecolores) n= 9.

Del total de aves colectadas, 1,291 (76.57%) fueron residentes y 377 (23.36%) fueron migratorias. Por estados los resultados fueron: Tamaulipas 856 (80%) residentes y 214 (20%) migratorias, Nuevo León 351 (75.97%) y 111 (24.02%), y Coahuila 84

(60.86%) y 54 (39.13%) respectivamente. Así como en Yucatán del total de aves capturadas obtuvieron un 59% (5566) aves residentes y 41% (3545) de aves migratorias (Farfán *et al.* 2004) encontrando así diferencias entre los porcentajes de los estudios, pero de igual manera se observa que en ambos estudios el mayor porcentaje fue encontrado en las aves residentes.

Así mismo las cinco especies migratorias colectadas con mayor frecuencia en los tres estados durante todo el periodo de estudio fueron: *Myiarchus tyrannulus* (33), *Melospiza lincolnni* (26), *Sayornis phoebe* (24), *Vermivora celata* (23) e *Icteria virens* (20). Por estado esto se comporto diferente, ya que para Tamaulipas fueron: *Myiarchus tyrannulus* (33), *Melospiza lincolnni* (20), *Sayornis phoebe* (17), *Vermivora celata* (17), e *Icteria virens* (13). Para Nuevo León: *Calamospiza melanocorys* (10), *Dendroica coronata* (9), *Spizella passerina* (8) y *Sayornis phoebe* (6), *Vermivora celata* (6), y *Melospiza lincolnni* (6) individuos cada una. Para Coahuila las especies fueron: *Passerina ciris* (9), *Passerina caerulea* (9), *Chondestes gramacus* (7), *Icteria virens* (7) y *Baelophus bicolor* (6).

De el total de aves colectadas, 90 resultaron seropositivas al WNV por medio de la prueba de ELISA de bloqueo para la detección de anticuerpos neutralizantes para este virus; 43 en Nuevo León, 39 en Tamaulipas, y 8 para el estado de Coahuila en todo el período de estudio, además las especies seropositivas correspondieron a los órdenes, Passeriformes, Columbiformes, Strigiformes, Piciformes y Galliformes; dentro de un total de 20 familias y 39 especies. Así como en Yucatán el 21 (0.24%) de las aves presentaron evidencia de WNV, perteneciendo a 15 especies 11 familias y dos ordenes (Farfán *et al.*2004). También concordando con los estudios de (Komar *et al.*2001), donde más de siete ordenes de aves probaron seropositividad a WNV, siendo los de mayor importancia Passeriformes, Columbiformes, Galliformes y Anseriformes, además concordando con otro estudio de Komar *et al.*2003, en donde de 25 especies de aves, representando un amplio rango de órdenes y familias, al ser expuestas a la infección por picadura de mosquitos se determino que los ordenes Passeriformes y Charadriiformes son los principales hospederos amplificadores de este virus. A diferencia de esto, aquí se encontraron cuatro órdenes más con aves seropositivas (Columbiformes, Strigiformes,

Piciformes y Galliformes); además, en otros estudios estos órdenes han sido reportados con especies seropositivas por los monitoreos realizados en el CDC.

También Ringia (2004) en su monitoreo encontró 1784 aves representando 10 órdenes y 81 especies; donde Anticuerpos para WNV fueron encontrados en 94 aves pertenecientes a los ordenes Anseriformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, y Strigiformes, al comparar estos resultados con los aquí reportados se puede observar que son prácticamente idénticos, incluyendo el numero de aves colectadas, y el numero de positivos; discrepando sólo en uno de los ordenes de seropositivos colectados por este estudio el cual fue Piciformes y ellos obtuvieron Anseriformes.

De las 90 aves que resultaron seropositivas por ELISA para WNV, 58 (64.44%) fueron residentes y 32 (35.55%) fueron migratorias. Por estados los resultados fueron: Tamaulipas 30 (76.92%) residentes y 9 (23.07%) migratorias, además las especies residentes *Mimus polyglottos* (8) y *Cardinalis cardinalis* fueron de las seropositivas las de mayor numero: n= 8 y 5 respectivamente. Para Nuevo León 24 (56.09%) y 19 (43.90%) donde las especies seropositivas con mayor frecuencia fueron como residentes *Cardinalis cardinalis*, *C. sinuatus*, y *Melanerpes aurifrons*, con 4 ejemplares cada uno y la especie migratoria positiva con mayor frecuencia fue *Sayornis phoebe* con 3 ejemplares. Para Coahuila 4 (50%) y 4 (50%) respectivamente. Las aves que el equipo de Yucatán colecto con más de una ave seropositiva fueron colorin azul (*Passerina cyanea*) con cinco ejemplares, dos papamoscas tiranos (*Myiarchus tyrannulus*), y dos picogordos pecho rosa (*Pheucticus ludovicianus*) (Farfán *et al.* 2004). Al comparar entre los estados las especies migratorias que fueron seropositivas, se encontró que entre Tamaulipas y Nuevo León solo *Sayornis phoebe* se capturo en ambos estados, y entre Nuevo León y Coahuila la única especie capturada en común fue *Baeolophus bicolor*, además entre Coahuila y Tamaulipas ninguna especie fue colectada en común, no obstante en total entre los tres estados hubo 16 especies migratorias seropositivas, dato importante ya que las aves migratorias han sido consideradas como los principales hospederos introductores del WNV a nuevas ares ocurriendo esto al final del verano o principios de otoño, coincidiendo con el arribo de grandes cantidades de aves migratorias (Taylor *et al.* 1956; Work *et al.* 1955); también las aves migratorias han sido

ligadas al transporte de virus relacionados en el Hemisferio Occidental (Calisher 1970; Reeves *et al.* 1974).

Al buscar una correlación entre variables de nuestro estudio en cuanto a si existe una dependencia entre ellas con los resultados de la prueba de ELISA, se llevo acabo el análisis de los datos por medio de tablas cruzadas (Crosstabulation) en las cuales se correlaciono las variables de espacio (localidad, estado), Tiempo (mes), y estatus (residente o migratorios) contrastados con el número de aves positivos y negativos por la técnica de ELISA, y al comparar los estados se encontró que el estado de Tamaulipas, tiene dependencia altamente significativa a las variables de localidades y mes de colecta, con una  $X^2$  de 99.949 y 124.074 respectivamente con una  $p < 0.001$ , con una dependencia y asociación altamente significativa; así mismo las aves migratorias al contrastarlas con las localidades ( $X^2$  de 35.523 con una  $p < 0.001$ ) fue la variable que tubo mayor asociación y dependencia significativa. Al compararlo con Nuevo León también tuvo dependencia altamente significativa para ambas variables, ( $X^2$  de 79.883 y 70.370, respectivamente con una  $p < 0.001$ , con dependencia y asociación altamente significativa); de manera importante se observo concordancia al comparar las aves migratorias con las de Tamaulipas encontrando el mismo patrón ( $X^2$  de 44.807 con una  $p < 0.001$ ) que fue la variable que tubo mayor asociación y dependencia altamente significativa. Al contrastar esto con Coahuila, el cual tubo dependencia altamente significativa para ambas variables obteniendo valores de  $X^2$  de 21.483 y una  $p < 0.001$  tanto para las variables de localidad y mes, ya que contienen los mismos resultados en las tres colectas, además para este estado no se encontró asociación significativa.

Durante el periodo de estudio se llevaron a cabo un total de 39 colectas de suero de caballos en Nuevo León y Coahuila, y se tomaron 498 muestras de sangre de las cuales 474 (95.18%) fueron para Nuevo León, y 24 (4.81%) para Coahuila, del total de caballos muestreados, 116 (23.29%) resultaron seropositivos para la prueba de ELISA de detección de anticuerpos neutralizantes contra flavivirus, 100 en Nuevo León y 16 en el estado de Coahuila, que fue menor al porcentaje de seropositividad encontrado en Guatemala de septiembre del 2003 a Marzo del 2004 que fue un (42.3%) (Morales-Betoulle 2006). Pero si mayor al porcentaje de seropositivos en Cuba el cual fue de 9%

(Pupo, et al 2006), siendo mas parecido al porcentaje de el Salvador que fue de 25% (Cruz *et al.* 2005).

Para Coahuila en los tres municipios donde se colecto en Diciembre del 2002, resultaron positivos, 78.57%, 80% y 100% para los municipios de Ciudad Acuña, Jiménez y Saltillo respectivamente. Para el estado de Nuevo León se encontraron sueros de caballos seropositivos a WNV en 16 de los 17 municipios en que se colecto de los meses de Febrero a Julio del 2003. Observando que en las colectas de Mayo 2004 se colecto en seis municipios donde todas las localidades resultaron positivas: Pesquería (33.33%), Santiago (40.47%), Juárez (50%), Dr. González (78.57%), Zuazua (80.65%) y Marín (100%).

## 9. CONCLUSIONES

En este estudio el porcentaje de las aves residentes capturadas fue mayor al de las aves migratorias, de igual manera por estados, esta tendencia se comporto igual. Lo anterior sugiere que la probabilidad de que el WNV halla llegado al Norte de México, como se había esperado desde el momento en que comenzó a dispersarse hacia el sur de los Estado Unidos de América, por medio de las aves migratorias que pasan su tiempo de invierno en tierras mas calidas en el sur del continente Americano, de tal manera que estas aves tuvieron que atravesar el norte de México.

Por medio de la prueba de ELISA de bloqueo se pudo comprobar la presencia del WNV en los tres estados que conforman el Noreste de México. Las aves seropositivas pertenecieron a una amplia gama de órdenes, familias y especies, en las cuales se pudo observar que el porcentaje de residentes fue mayor que el de aves migratorias, indicando que definitivamente el WNV esta presente y ampliamente distribuido en los tres estados de estudio. Esto también sugiere que los mosquitos de la región se infectaron al alimentarse de aves migratorias que atravesaron estos estados y a su vez infectaron a las aves residentes en alimentaciones posteriores. Además de aves, al haber encontrado seropositividad en suero de caballos de todos los municipios donde se colecto en el 2004, al relacionar esto con el hecho de que el porcentaje de las aves residentes fue mayor que el de migratorias esto indica que el WNV esta circulando en el Noreste de México ya en un ciclo enzotico propio de la región y al mismo tiempo aves migratorias siguen acarreado el virus de Estados Unidos hacia México.

## 10. LITERATURA CITADA

- Alsop, F.J. 2001. Birds of North America. Smithsonian Institute. D K Publishing, Inc., New York.- 1007.
- Baqar S, Hayes CG, Murphy JR, Watts DM. Vertical transmission of West Nile virus by Culex and Aedes species mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 1993 Jun;48(6):757-62.
- Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kauffman EB, Ebel G, Dupuis AP 2nd, Ngo KA, Nicholas DC, Young DM, Shi PY, Kulasekera VL, Eidson M, White DJ, Stone WB, Kramer LD; NY State West Nile Virus Surveillance Team. West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. Emerg Infect Dis. 2001 Jul-Aug;7(4):679-85.
- Blaskovic D, Ernek E. Birds as hosts of arboviruses in Europe. In: Cherepanov IA, editor. Transcontinental connections of migratory birds and their role in the distribution of arboviruses. Novosibirsk, Russia: Nauka; 1972. p. 161-7.
- Blitvich BJ, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero J.F., Marlenee N.L., Gonzalez-Rojas JI, Komar. 2003. Serologic Evidence of West Nile virus infection in Horses, Coahuila State, Mexico. Emerg Infect Dis.;10(7):1314-7.
- Blitvich BJ, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero JF, Lorono-Pino MA, Marlenee NL, Diaz FJ, Gonzalez-Rojas JI, Obregon-Martinez N, Chiu-Garcia JA, Black WC 4th, Beaty BJ. 2004. Phylogenetic analysis of West Nile virus, Nuevo León State, Mexico. Emerg Infect Dis. Jul;10(7):1314-7.
- Bowen, G. S., and D. B. Francy. 1980. Surveillance, p. 473-499. In T. P. Monath (ed.), St. Louis encephalitis. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, Godsey MS, Baker D, Hettler DL, Holmes DA, Biggerstaff BJ, Mitchell CJ. 2002. Experimental infection of horses with West Nile virus. Emerg Infect Dis.;8(4):380-6.
- Calisher CH, Karabatsos N, Zeller H, Digoutte JP, Tesh RB, Shope RE, Travassos da Rosa AP, St George TD. Antigenic relationships among rhabdoviruses from vertebrates and hematophagous arthropods. Intervirology. 1989;30(5):241-57. No abstract available.

- Centers of Disease Control and Prevention. 1999. Outbreak of West Nile-Like viral encephalitis-New York 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 48; 845-849 .
- Centers of Disease Control and Prevention. 2000. Update. West Nile virus activity – Eastern United States, 2000. *MMWR*. 49; 1044 -47
- Cruz L, Cardenas VM, Abarca M, Rodriguez T, Reyna RF, Serpas MV, Fontaine RE, Beasley DW, Da Rosa AP, Weaver SC, Tesh RB, Powers AM, Suarez-Rangel G. 2005. Short report: serological evidence of West Nile virus activity in El Salvador. *Am J Trop Med Hyg*. May;72(5):612-5.
- Eidson M, Kramer L, Stone W, Hagiwara Y, Schmit K, The New York State West Nile Virus Surveillance Team. Dead bird surveillance as an early warning system for West Nile virus. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:631–5.
- Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Beasley DW, Coffey L, Carrara AS, Travassos da Rosa A, Clements T, Wang E, Ludwig GV, Cortes AC, Ramirez PP, Tesh RB, Barrett AD, Weaver SC. 2003. West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis*. 2003 Dec;9(12):1604-7.
- Farfan-Ale JA, Blitvich BJ, Lorono-Pino MA, Marlenee NL, Rosado-Paredes EP, Garcia Rejon JE, *et al*. Longitudinal studies of West Nile virus infection in avians, Yucatan State, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2004;4:3–14.
- Fitzpatrick, J.W. 2000. *National Geographic Field Guide to the Birds of North America*. Fourth Edition. Washington, D.C.-480.
- Han LL, Popovici F, Alexander JP Jr, Laurentia V, Tengelsen LA, Cernescu C, Gary HE Jr, Ion-Nedelcu N, Campbell GL, Tsai TF. Risk factors for West Nile virus infection and meningoencephalitis, Romania, 1996. *J Infect Dis*. 1999 Jan;179(1):230-3.
- Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*. 1999 Sep-Oct;5(5):643-50.
- Komar, N. 2000. West Nile Virus encephalitis. *Rev Sci Tech*;19: 166-176
- Komar N. West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Dec;951:58-73. Review.
- Komar, N. 2003. West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res*. 61:185-234.
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ. 1999. Origin of the West Nile virus responsible

for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States.  
:17;286(5448):2333-7.

Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drouet MT, Deubel V. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis.* 2002 Apr;8(4):392-7.

Monath, T. P. 1984. Ecology and control of mosquito-borne arbovirus diseases, p. 115–134. *In* E. Kurstak and R. Marusyk (ed.), *Control of virus diseases*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. VOL. 40, 2002 west nile virus antigen detection 2029.

Moore, C.G., McLean, R.G., Mitchell, C.J. 1993. Guidelines for arbovirus surveillance in the United States. Fort Collins, CO: U.S.D.H.H.S./P.H.S./ C.D.C./ N.C.I.D. /D.V.B.I.D.

Morales-Betoulle ME, Morales H, Blitvich BJ, Powers AM, Davis EA, Klein R, Cordon-Rosales C. 2006. West Nile virus in horses, Guatemala. *Emerg Infect Dis.* 2006 Jun;12(6):1038-9.

Oustland, E.N., Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Oliver Williams W, and Schmitt BJ. Equine West Nile Encephalitis, United States. 1999. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 665-669

Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina OY, Tyutyunnik EN, Frolochkina TI, Lanciotti RS, Yazyshina S, Platonova OV, Obukhov IL, Zhukov AN, Vengerov YY, Pokrovskii VI. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis.* 2001 Jan-Feb;7(1):128-32.

Pupo, M., Guzman MG, Fernandez R, Llop A, Dickinson FO, Perez D, Cruz R, Gonzalez T, Estevez G, Gonzalez H, Santos P, Kouri G, Andonova M, Lindsay R, Artsob H, Drebot M. 2006. West Nile Virus infection in humans and horses, Cuba. *Emerg Infect Dis* ;12(6):1022-4.

Ralph, C.J., Geupel, G R., Pyle, P., Martin, T.E., DeSante, D.F., Mila, B. 1996. *Manual de metodos de campo para el monitoreo de aves terrestres*. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, US Department of Agricultura. 8-24

Rappole JH, Ramos MA, Oehlenschlager RJ, Warner DW, Barkan CP. Timing of migration and route selection in North American songbirds. *In*: Drawe L, editor. *Proceedings of the First Welder Wildlife Foundation Symposium*. Sinton (TX): Welder Wildlife Foundation; 1979. p. 199-214.

Rappole JH, Ramos MA. Factors affecting migratory bird routes over the Gulf of México. *Bird Conservation International* 1994;4:131-42.

- Rappole, J. H, S. R. Derrickson, & Z. Hubalek. 2000. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis.* 6:319-28.
- Reiter, P. Weather, vector biology and arboviral recrudescence. In Monath T.P. editor. *The arboviruses Epidemiology and Ecology.* Boca Raton (FL).1999 Press 245-55pp
- Reeves,WC. Overwintering of arboviruses. *Prog Med Virol* 1974;17:193-220.
- Ringia AM, Blitvich BJ, Koo HY, Van de Wyngaerde M, Brawn JD, Novak RJ. 2004. Antibody prevalence of West Nile virus in birds, Illinois, 2002. *Emerg Infect Dis.* Jun; 10(6):1120-4.
- Langevin SA, Brault AC, Panella NA, Bowen RA, Komar N (2005) Variation in virulence of West Nile virus strains for house sparrows (*Passer domesticus*). *Am J Trop Med Hyg* 72:99-102
- Steele, K. E., Linn, M. J. ., Schoepp ,R. J, Komar, N. , Geisbert, T. W., Manduca, R. M. , Calle, P. P. , Raphael, B. L. , Clippinger, T. L. , Larsen, T. , Smith, J. , Lanciotti, R. S., Panella ,N. A. and McNamara, T. S. 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.
- Sullivan, H.; Linz, G.; Clark, L.; Salman, M. 2006. West Nile Virus Antibody Prevalence in Red-Winged Blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) from North Dakota, USA (2003-2004). *Vec-Born Zoon Dis* 6 : 305 - 309
- Swayne, D.E., Beck, J.R., Smith, C.S., Shieh, W., Zaki, S.R. 2000. Fatal Encephalitis and Myocarditis in Young Domestic Geese (*Anser anser domesticus*) Caused by West Nile Virus. *Emerg Infect Dis*; 7:1-5.
- Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, Rizk F. A study of ecology of the West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 1956;5:579-620.
- Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet.* 1998 Sep 5;352(9130):767-71.
- Turell, M. J., M. O'Guinn & J. Oliver. 2000. Potential of New York Mosquitoes to Transmit West Nile Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 413- 414.

Work, T.H., Hurlbut, H.S, Taylor, R.M.1955. Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. Am J Trop Med Hyg.; 4(5):872-88.

[www.coahuila.gob.mx](http://www.coahuila.gob.mx)

[www.data.nl.gob.mx/Geografia/CartoBasica/NuevoLeon/Ecologicas](http://www.data.nl.gob.mx/Geografia/CartoBasica/NuevoLeon/Ecologicas). Fuente: Anuario Estadístico 2002 Nuevo León, SAGARPA.

[www.environmentalrisk.cornell.edu/WNV/WNV-LArchive/2002bysubject.html](http://www.environmentalrisk.cornell.edu/WNV/WNV-LArchive/2002bysubject.html) (2002)

[www.michigan.gov/mda](http://www.michigan.gov/mda). (The Michigan Department of Agriculture, 2006).

[www.tamaulipas.gob.mx/gobierno/compromisos/compromisos10.pdf](http://www.tamaulipas.gob.mx/gobierno/compromisos/compromisos10.pdf)

## 11. APENDICE

Apéndice 1. Listado de especies de aves colectadas durante el periodo de estudio en orden filogenético.

Orden	Familia	Genero y especie	Nombre común
Anseriformes	Anatidae	<i>Anas discors</i>	cerceta alazul
		<i>Aythya americana</i>	pato cabeza-roja
Galliformes	Phasianidae	<i>Gallus gallus</i>	Gallo domestico
	Odontophoridae	<i>Callipepla squamata</i>	codorniz escamosa
		<i>Colinus virginianus</i>	codorniz cotui
Ciconiiformes	Cathartidae	<i>Cathartes aura</i>	zopilote aura
Falconiformes	Accipitridae	<i>Accipiter striatus</i>	gavilán pecho-rufo
		<i>Accipiter cooperii</i>	gavilán de Cooper
Gruiformes	Rallidae	<i>Fulica americana</i>	gallareta americana
Charadriiformes	Charadriidae	<i>Charadrius vociferus</i>	chorlo tildío
	Scolopacidae	<i>Actitis macularia</i>	playero alzacolita
		<i>Numenius americanus</i>	zarapito pico largo
	Laridae	<i>Sterna forsteri</i>	charran de Forster
Columbiformes	Columbidae	<i>Zenaida asiatica</i>	paloma alablanca
		<i>Zenaida macroura</i>	paloma huilota
		<i>Columbina inca</i>	tórtola colalarga
		<i>Columbina passerina</i>	tórtola coquita
		<i>Leptotila verreauxi</i>	paloma arroyera
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Coccyzus americanus</i>	cuclillo pico-amarillo
		<i>Crotophaga sulcirostris</i>	garrapatero pijuy
Strigiformes	Strigidae	<i>Micrathene withneyi</i>	tecolote enano
		<i>Otus asio</i>	tecolote oriental
		<i>Otus kenicoti</i>	tecolote occidental
Caprimulgiformes	Caprimulgidae	<i>Chordeiles acutipenis</i>	chotacabras menor
		<i>Chordeiles minor</i>	chotacabras zumbón
		<i>Nyctidromus albicollis</i>	chotacabras puraqué
		<i>Caprimulgus vociferus</i>	tapacamino cuerporruin norteño

APENDICE 1. (Continuación).

Orden	Familia	Genero y especie	Nombre común
Coraciiformes	Alcedinidae	<i>Ceryle torquatus</i>	martín-pescador de collar
		<i>Chloroceryle americana</i>	martín-pescador verde
Piciformes	Picidae	<i>Melanerpes aurifrons</i>	carpintero cheje
		<i>Picoides scalaris</i>	carpintero mexicano
Passeriformes	Tyrannidae	<i>Camptostoma imberbe</i>	mosquero lampiño
		<i>Empidonax flaviventris</i>	mosquero vientre amarillo
		<i>Sayornis phoebe</i>	papamoscas fibi
		<i>Myiarchus cinerascens</i>	papamoscas cenizo
		<i>Myiarchus crinitus</i>	papamoscas viajero
		<i>Myiarchus tyrannulus</i>	papamoscas tirano
		<i>Pitangus sulphuratus</i>	luis bienteveo
		<i>Myiozetetes similis</i>	luis gregario
		<i>Tyrannus melancholicus</i>	tirano tropical
		<i>Tyrannus couchii</i>	tirano silbador
		<i>Tyrannus vociferans</i>	tirano gritón
		<i>Tyrannus tyrannus</i>	tirano dorso negro
	<i>Tyrannus forficatus</i>	tirano-tijereta rosado	
	Laniidae	<i>Lanius ludovicianus</i>	alcaudón verdugo
	Vireonidae	<i>Vireo griseus</i>	vireo ojos blancos
		<i>Vireo atricapilla</i>	vireo gorra negra
		<i>Vireo solitarius</i>	vireo cabeza azul
		<i>Vireo olivaceus</i>	vireo ojo rojo
		<i>Vireo flavoviridis</i>	vireo verdeamarillo
	Corvidae	<i>Cyanocorax yncas</i>	chara verde
		<i>Cyanocorax morio</i>	chara papan
		<i>Corvus imparatus</i>	cuervo tamaulipeco
	Paridae	<i>Baeolophus bicolor</i>	cabonero cresta-negra
	Remizidae	<i>Auriparus flaviceps</i>	baloncillo
	Troglodytidae	<i>Campylorhynchus brunneicapillus</i>	matraca del desierto
		<i>Salpinctes obsoletus</i>	chivirin saltaroca
		<i>Thryomanes bewickii</i>	chivirin cola oscura
		<i>Troglodytes aedon</i>	chivirin saltapared

APENDICE 1. (Continuación).

Orden	Familia	Genero y especie	Nombre común
Passeriformes	Sylviidae	<i>Polioptila caerulea</i>	perlita azul-gris
		<i>Polioptila melanura</i>	perlita del desierto
		<i>Polioptila nigriceps</i>	perlita sinaloense
	Muscicapidae	<i>Hylocichla mustelina</i>	zorzal maculado
	Turdidae	<i>Sialia mexicana</i>	azulejo garganta azul
		<i>Catharus guttatus</i>	zorzal cola rufa
		<i>Turdus grayi</i>	mirlo pardo
	Mimidae	<i>Dumetella carolinensis</i>	maullador gris
		<i>Mimus polyglottos</i>	centzontle norteño
		<i>Toxostoma longirostre</i>	cuitlacoche pico largo
		<i>Toxostoma curvirostre</i>	cuitlacoche pico curvo
	Motacillidae	<i>Anthus spragueii</i>	bisbita llanera
	Parulidae	<i>Vermivora celata</i>	chipe corona anaranjada
		<i>Vermivora ruficapilla</i>	chipe de coronilla
		<i>Parula americana</i>	parula norteña
		<i>Dendroica petechia</i>	chipe amarillo
		<i>Dendroica coronata</i>	chipe coronado
		<i>Mniotilta varia</i>	chipe trepador
		<i>Helmitheros vermivora</i>	chipe gusanero
		<i>Seiurus auricapilla</i>	chipe suelero
		<i>Seiurus noveboracensis</i>	chipe charquero
		<i>Oporornis formosus</i>	chipe patilludo
		<i>Geothlypis trichas</i>	maskarita común
		<i>Wilsonia citrina</i>	chipe encapuchado
		<i>Wilsonia pusilla</i>	chipe corona negra
	<i>Icteria virens</i>	buscabreña	
	Thraupidae	<i>Piranga rubra</i>	tángara roja
	Emberizidae	<i>Arremonops rufivirgatus</i>	rascador oliváceo
		<i>Aimophila cassinii</i>	zacatonero de Cassin
		<i>Aimophila ruficeps</i>	zacatonero corona-rufa
		<i>Spizella passerina</i>	gorrión ceja blanca
		<i>Spizella pallida</i>	gorrión pálido
<i>Spizella breweri</i>		gorrión de Brewer	
<i>Chondestes grammacus</i>		gorrión arlequín	
<i>Amphispiza bilineata</i>		zacatonero gargantanegra	
<i>Calamospiza melanocorys</i>		gorrión ala blanca	
<i>Passerculus sandwichensis</i>		gorrión sabanero	

APENDICE 1. (Continuación).

Orden	Familia	Genero y especie	Nombre común
Passeriformes	Emberizidae	<i>Ammodramus savannarum</i>	gorrión chapulín
		<i>Zonotrichia leucophrys</i>	gorrión corona blanca
		<i>Melospiza lincolni</i>	gorrión de Lincoln
	Cardinalidae	<i>Rhodothraupis celaeno</i>	picogordo cuello rojo
		<i>Cardinalis cardinalis</i>	cardenal rojo
		<i>Cardinalis sinuatus</i>	cardenal pardo
		<i>Pheucticus melanocephalus</i>	picogordo tigrillo
		<i>Passerina caerulea</i>	picogordo azul
		<i>Passerina cyanea</i>	colorin azul
		<i>Passerina versicolor</i>	colorin morado
		<i>Passerina ciris</i>	colorin sietecolores
	<i>Spiza americana</i>	arrocero americano	
	Icteridae	<i>Agelaius phoeniceus</i>	tordo sargento
		<i>Sturnella magna</i>	pradero tortilla-con-chile
		<i>Sturnella neglecta</i>	pradero occidental
		<i>Quiscalus mexicanus</i>	zanate mexicano
		<i>Molothrus bonariensis</i>	Tordo común
		<i>Molothrus aeneus</i>	tordo ojo rojo
		<i>Molothrus ater</i>	tordo cabeza café
		<i>Icterus spurius</i>	bolsero castaño
		<i>Icterus cucullatus</i>	bolsero encapuchado
		<i>Icterus gularis</i>	bolsero de Altamira
		<i>Icterus graduacauda</i>	bolsero cabeza negra
<i>Icterus parisorum</i>	bolsero tunero		
Fringillidae	<i>Carpodacus mexicanus</i>	pinzón mexicano	
	<i>Carduelis psaltria</i>	jilguero dominico	
Passeridae	<i>Passer domesticus</i>	gorrión casero	

**CAPITULO III**  
**VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN MOSQUITOS**

## 1. RESUMEN

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

## 2. INTRODUCCION

El WNV es transmitido a las personas a través de la picadura de un mosquito infectado. El principal transmisor del Virus del Nilo Occidental es el mosquito común (*Culex pipiens*). Los mosquitos se convierten en transmisores del virus cuando éstos se alimentan de aves infectadas con el WNV. Una vez que el mosquito es infectado, puede transmitir el virus a las personas o a otros animales cuando éstos son picados. Muchas aves pueden ser infectadas con el WNV, pero son los cuervos y Los azulejos (*blue jays*) los que más comúnmente mueren debido a la infección. Los caballos también son propensos a sufrir infecciones severas por WNV. Las personas no pueden adquirir el virus directamente de otras personas o de caballos que tengan la enfermedad ([http://ohioline.osu.edu/wnv-fact/1008\\_es.html](http://ohioline.osu.edu/wnv-fact/1008_es.html)).

En cuanto a las especies de mosquitos involucradas como vectores probados del Virus del Oeste del Nilo, más de 35 especies han sido encontradas infectadas con WNV. Los géneros más frecuentes de Culicidae registrados en la epidemia de Nueva York fueron: *Aedes*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Culiseta*, *Psorophora*, y el grueso de ellos correspondió a *Culex*, el mosquito café de las casas, además de *Culex restuans* y *Culex sallinarius*. Notablemente las especies *Culex pipiens* y *quinquefasciatus* fue donde mas frecuentemente se aisló Virus del Oeste del Nilo a través de la prueba de cultivo en placas de células Vero (Nasci *et al.* 2001).

Los sitios de oviposición de las especies de *Culex* tienen que ver con cuerpos de agua con elevada cantidad de materia orgánica, en otras palabras, agua pestilente, lo cual se fácil de localizar en arroyos urbanos con aguas estancadas; tubería de drenaje pluvial, recipientes peridomésticos en patios como llantas abandonadas y bebedores de animales. Esto plantea un problema de control para los programas del sector salud, no acostumbrados a aplicar medidas de control en estos criaderos, pues los últimos 20 años ellos se han concentrado en el mosquito del Dengue, *Aedes aegypti*, quien a diferencia

de *Culex*, prefiere para oviponer pequeños recipientes domésticos con agua limpia y bajo sombra (Fernández 1999).

### 3. HIPOTESIS

El mosquito *Culex quinquefasciatus* se encontrara positivo al Virus del Oeste del Nilo ya que de los mosquitos del complejo de *Culex* en esta región es el más abundante, por lo que será el primer paso para considerar a este mosquito como un vector potencial de este virus.

#### 4. OBJETIVOS

- 1.-Monitorear y diagnosticar la presencia del Virus del Oeste del Nilo, en mosquitos del estado de Nuevo León, México.
- 2.-Comparar los diferentes métodos de colecta en mosquitos del estado de Nuevo León, México.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Aislamiento y monitoreo de WNV en mosquitos

En Connecticut, en el periodo de Junio a Octubre del 2000 se obtuvieron 14 aislamientos de WNV de 4 especies de mosquitos (*Cx. pipiens* (5), *Cx. salinarius*, *Cx. restuans* (4), y *Cs. melanura* (3)). La identificación se realizó por RT-PCR. Analizaron 137,199 mosquitos agrupados en 9,085 grupos de 8 géneros y 32 especies. La mayoría de los aislamientos los obtuvieron en áreas donde hubo grandes densidades de mosquitos, además donde existió una alta tasa de mortalidad en cuervos durante el brote de 1999. y concluyeron que *Cx. restuans* pareció ser el responsable de la transmisión de WNV a las aves durante el inicio del verano, *Cx. pipiens* empezó a tener un papel importante en la amplificación del virus al final de esta temporada, *Cs. melanura* pudo ser importante en la transmisión del WNV a nivel de aves silvestres, y *Cx. salinarius* pudo haber sido el puente entre humanos y caballos (Andreadis *et al.* 2001).

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

También en Staten Island, New York, en el 2000 se llevo a cabo un programa de vigilancia epidemiológica del WNV en donde encontraron positivos a este virus, a *Ae. vexans*, *Cx. pipiens*, *Cx. salinarius*, *Oc. triseriatus*, *Ps. ferox* y *An. punctipennis* y

propusieron un modelo de transmisión que envuelve a *Cx. pipiens* y *Cx. restuans* como vectores primarios enzoóticos y epizoóticos entre aves, *Cx. salinarius* fue el vector puente primario para humanos y para caballos *Aedes/Ochlerotatus*. Se probaron 24, 068 mosquitos que se agruparon en 7 géneros y 23 especies de mosquitos (967 grupos), de los cuales 131 fueron positivos al virus (Kulasekera *et al.* 2001).

En el 2000 se implementó un programa de vigilancia para monitorear brotes de WNV sobre los mosquitos, en 1999; esto se debió a los primeros brotes del WNV en América (Área de New York y New Jersey), el programa lo empezaron en las primeras semanas de septiembre de ese año, y siguieron hasta el siguiente mes, los mosquitos fueron colectados por medio de trampas de gravidez. Analizaron 32,814 mosquitos, representados en 25 especies, y agrupados en 1,853 grupos (*Cx. pipiens*, 511 mosquitos, *Cx. pipiens/restuans* 4,686, y *Cx. restuans*, 215); la identificación del virus la realizaron por medio de la técnica molecular de RT-PCR específico del virus y cultivo de células Vero, y aislaron al virus de 15 grupos de mosquitos colectados, la mayoría de los aislamientos fueron de mosquitos *Cx. pipiens* (6 grupos), *Cx. pipiens/restuans* (7 grupos). Otros de los virus identificados fueron del Subgrupo California, Flanders y EEE (Nasci *et al.* 2001).

El departamento de Control de Mosquitos del Condado de Harris, en Texas, desde 1975 estableció un programa de vigilancia para Encefalitis de San Luis(SLE) en el cual los mosquitos son tamizados por una prueba de inmunoensayo de captura de antígeno; sin embargo en el 2002 implementaron este mismo tipo de prueba pero para WNV; de un total de 260,138 mosquitos *Cx. quinquefasciatus* colectados, procesados en 6,093 pools, encontraron 28 pools que fueron positivos para SLE, y 851 que fueron positivos para WNV. El periodo de actividad viral en mosquitos en ese año fue de junio 11 a noviembre 1 (Lillibridge *et al.* 2004).

Se monitoreo la prevalencia del WNV en mosquitos, en las áreas donde estuvieron capturando cuervos, en la parte este-centro de Illinois, los mosquitos fueron colectados por trampas de luz con CO<sub>2</sub>, además de trampas de gravidez; este proyecto se

realizó por 15 semanas entre Mayo y Septiembre del 2002; Capturaron 595 grupos de mosquitos (grupos de 1 a 50 especímenes), que se agruparon en 10 especies, pero para el género *Culex*, no lo identificaron a nivel específico; estos 20 grupos se encontraron positivos a WNV a mediados de Julio y finales de Septiembre, 18 fueron de hembras y 1 de machos de *Culex* sp, y 1 de *An. punctipennis* (Say). 14 de los grupos los capturaron trampas de gravidez y el resto en trampa de luz con CO<sub>2</sub> (Yaremych *et al.* 2004).

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

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

## **5.2 Efecto de la temperatura sobre el WNV y otros arbovirus**

En un estudio realizado en San Antonio, Texas, se encontró que el tiempo de incubación del virus de la Encefalitis San Luis en *Cx. quinquefasciatus*, desde la infección hasta la transmisión por medio de la alimentación del mosquito, tuvo una relación con la temperatura, y dentro el rango de 20 – 30°C, expresado por la ecuación

(T-17) D= 109, donde T= temperatura y D= Días. Similar a esto encontró que el tiempo de digestión de la comida de sangre entre 10 a 30°C, pudo calcular la ecuación de (T-5) D= 50. la razón entre los tiempos de incubación del virus y la digestión de sangre, revelan que la temperatura optima es de 30°C, la sobrevivencia de los mosquitos, bajo las condiciones experimentales para completar la incubación también fue optima a esa temperatura anterior, pero es adverso a 37°C, con una humedad relativa asociada de 37% (Hurlbut 1973).

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

### **5.3 Transmisión vertical del WNV y otros arbovirus**

En otro estudio se colocaron hembras de laboratorio de *Cx. quinquefasciatus* vírgenes con machos infectados del virus de encefalitis de San Luis (SLE), cuando estas hembras fueron probadas para detección del virus después de 7 a 28 días posteriores a la exposición a los machos infectados, y encontró que el 23 y el 25%, respectivamente fueron infectadas con este virus, de estas el 58% fueron hembras inseminadas y el 23%

fueron hembras vírgenes, esto demostró que hubo transmisión vertical de este virus, además que la transmisión venérea de machos a hembras demostró la horizontal, por lo que concluyó que si se encuentran a machos silvestres infectados verticalmente con SLE, podrían infectar a las hembras (Shroyer 1990).

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

#### **5.4 Comparación de los métodos de detección y transmisión experimental del WNV**

Se evaluó el potencial de los mosquitos de New York para transmitir el WNV, los mosquitos que se colectaron por trampa de luz con CO<sub>2</sub>, los inocularon oralmente, dejando que se alimentaran de pollos infectados con WNV, que aislaron de un cuervo muerto durante los brotes de 1999; los mosquitos fueron observados dos semanas postalimentación para determinar la infección, diseminación y tasa de transmisión. Encontraron que los mosquitos *Cx. pipiens* fueron susceptibles a la infección (81%), y de estos la tasa de diseminación fue del 16%, y la tasa de transmisión diseminada fue de 86%, los cuales la mayoría pudieron transmitir el virus por medio de su alimentación (Turell *et al.* 2000).

En experimentos de las tasa de infección, diseminación y transmisión para mosquitos expuestos oralmente al WNV, estuvieron cuatro especies de *Culex* incluyendo a *Cx. quinquefasciatus*, y una de *Coquilletidia* de Norte América. Para la especie

mencionada de *Culex* probaron 124 mosquitos, la tasa de infección oscilo de 50 a 94%, esto en Vero Beach, la tasa de diseminación fue de 5 a 22%, y la de transmisión fue de 0 a 20%, por medio de inoculación intratoracica encontraron un 94% de transmisión (Sardelis *et al.* 2001).

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

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

Se comparó la trascripción inversa de la reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR) Taq Man<sup>®</sup>, con el ensayo en placas de células Vero y el ensayo antigénico Vec Test<sup>™</sup> para la detección del RNA viral del WNV en mosquitos colectados en campo, procedentes de Staten Island, durante la epidemia de WNV en el 2000; estos mosquitos fueron identificados a especies y los agruparon en pools de 50 individuos, en

total probaron 10,866 especímenes, agrupados en 801 pools, y concluyeron que el ensayo de placa detectó el 74% de los pools positivos por RT-PCR, y el Vec Test detectó evidencia del antígeno viral en 60% de los positivos por Taq Man, además Vec Test detectó el 67% de los grupos que contenían virus vivo detectado por el ensayo en placa de células vero (Nasci *et al.* 2002).

## 5.5 Genoma viral

El genoma de WNV es aproximadamente unos 11,000 nucleótidos de largo, dependiendo de la cadena, esta constituido por tres genes estructurales los cuales son cápside (C), premembrana (prM), y la envoltura (E), además de tener siete genes no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, Y NS5 (Lanciotti 2002).

Análisis filogenéticos de cadenas de WNV han podido definir dos mayores líneas para este virus, línea I Y II; la línea I incluye los virus de Kunjin y también los de WNV, de Europa; Norte, Centro y Oeste de África y ahora América, la línea II incluye WNV's de Este, Oeste y Centro de África y Madagascar. De tal manera que la secuencia de nucleótidos de WNV-NY 99 confirmó que este es miembro de la línea I (Xi-Yu *et al.* 1999).

De 22 aislamientos que fueron colectados de 5 estados (Illinois, Alabama, Louisiana, Colorado, y Texas) se hizo extracción del RNA viral, por medio del uso de QiaAMP kit de extracción de RNA de 140ul de sobrenadantes de cultivos de células Vero O BHK, en las cuales se habían hecho los pasajes de los aislamientos originales, y se les hizo RT-PCR y posteriormente se secuenciaron. Al alinear las secuencias de los aislamientos y ser comparadas con la secuencia prototipo WNV-NY 99 se encontraron mutaciones nucleotídicas ocurridas en 33 posiciones (9 en la premembrana: prM y 24 en la envoltura E) con un total de siete substituciones de aminoácidos (2 en prM, y 5 en E), y la máxima divergencia de nucleótidos de los 22 aislamiento contra WNV-NY 99 fue de .35% con un promedio de divergencia nucleotídica de 18% (Davis *et al.* 2003).

## 6. MATERIAL Y METODO

### 6.1 Descripción del área de estudio

Las áreas de estudio donde fue llevado a cabo el presente trabajo fue en tres municipios del estado de Nuevo León, México. Los dos primeros son Guadalupe y Escobedo que pertenecen al área metropolitana de Monterrey y el tercero fue el municipio de Pesquería, que es un municipio conurbano.

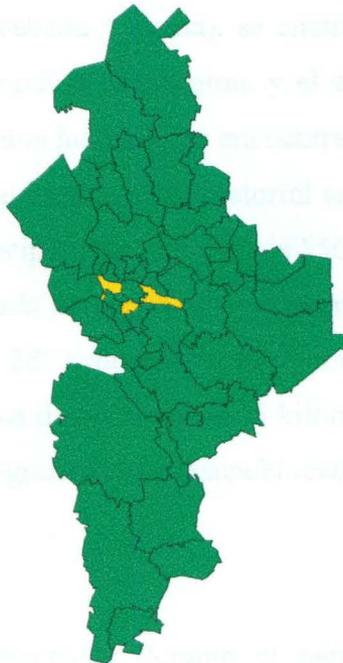


Figura 1. Municipios de colecta de mosquitos en el estado de Nuevo León, para el periodo de Junio del 2003 a Septiembre del 2004.

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

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

## **6.2 Colecta de mosquitos**

Los mosquitos fueron colectados durante el periodo de Junio del 2003 a Septiembre del 2004 empleando las siguientes técnicas de colecta mencionadas: Trampas de luz CDC miniatura de luz clara y negra mas dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Figura 2), aspirado por medio de un aspirador de espalda motorizado, para colectas intradomiciliares, peridomiciliares y en vegetación (Figura 3), colecta de estadios inmaduros con emergencia en laboratorio (demostrar posible transmisión transovárica), y cebo humano con aspirador bucal o aspirador mecánico de espalda (backpack

aspirator) de baterías. Después de la colecta, los mosquitos se transportaron en contenedores con hielo seco (CO<sub>2</sub>) al laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas, U. A. N. L., donde se separaron en grupos de mosquitos de 10 individuos (pool), separándose en especies, sexo, fecha y método de colecta, esto se realizó sobre una mesa fría y bajo observación del estereoscopio. Posteriormente los mosquitos fueron almacenados en un ultracongelador (-70 °C), y se transportaron en contenedores con hielo seco a University of Texas Medical Branch (UTMB), para ser procesados para el aislamiento del virus.



Figura 2. Trampa de Luz Tipo CDC.



Figura 3. Aspirador de espalda.

### 6.3 Aislamiento del Virus

Los grupos de mosquitos de 10 individuos fueron triturados manualmente, en 1 ml buffer salino de fosfatos (PBS, pH 7.4), que contenía 30% de suero bovino fetal, además de antibióticos (penicilina, estreptomina al 2% y anfotericina al 1%). La suspensión resultante se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos; después de la centrifugación, se tomaron 200  $\mu$ L de los sobrenadantes los cuales fue inoculados adentro de frascos de cultivos celulares con células Vero E6 o Vero 76 a los cuales se les descarto el medio de cultivo previamente, para inmediatamente después ser colocados en una incubadora a 37 °C. Después de 1 hora de absorción a 37 °C, se le añadió el medio de mantenimiento; el cultivo se mantuvo en una incubadora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> siendo revisados bajo el microscopio diariamente en busca de evidencia de efecto citopático (CPE).

Si se observaba el efecto citopático en las células Vero, se realizaban pruebas de inmunofluorescencia indirecta, prueba de la inhibición de la hemoaglutinación (HI), el ensayo antigénico Vec Test WNV/SLE (Medical Analysis Systems, Camarillo, CA) y transcripción inversa de la reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Se tituló el virus por medio del método de Overlay.

La prueba inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la detección de antígenos para WNV consistió en el uso de laminillas, que se prepararon obteniendo 15  $\mu\text{L}$  de las células del frasco por medio de raspado de la monocapa celular, los cuales fueron depositados en los pozos de la laminilla y se dejaron secar dentro de un gabinete de bioseguridad con flujo laminar, posteriormente se fijaron con acetona por 15 minutos, para al término de este tiempo dejarlas secar. Una vez secas las laminillas se agregan 20  $\mu\text{L}$  el anticuerpo ya sea mono o policlonal y se ponen a incubar en una cámara húmeda a 37°C por 1 hora. Transcurrido el tiempo se hacen 2 lavados de 10 minutos y se agregan 20  $\mu\text{L}$  el conjugado el cual es antimouse/evanblue y se incuban de nuevo en cámara húmeda a 37°C as cuales se colocaron en los pozos y se incubaron por 1 hora a 37°C, posteriormente siguieron 2 lavados y se dejan secar al aire en una incubadora y se procedió a realizar la observación.

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

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

El método de Overlay para la titulación de un virus, utilizó placas de 24 pozos con células vero, en los cuales se colocaron las diluciones del virus previamente hechas

de la siguiente manera: se marcaron 6 tubos a los cuales se les añadió 450  $\mu$ L de PBS-PS+FBS, y al primer tubo se le añadió 50 $\mu$ L de la muestra original del virus, para después tomar 50 $\mu$ L de este primer tubo y adicionarlo al siguiente tubito y así sucesivamente hasta terminar en el sexto tubito. Se añadieron posteriormente la soluciones de Overlay, las cuales se preparan en dos frascos, uno de un litro y otro de 250 ml en donde en el primero se mezcló agua estéril y agar al 2%, y en el otro se mezcló red eye, bicarbonato y Dextran, posteriormente se pusieron a hervir, y a 40°C, se mezclan, y se le aplicó 0.8 ml a cada pozo de la placa y se incubó a 37°C; y al tercer día, y se le añadió un segundo Overlay, que lleva los mismos componentes que el primero pero además rojo neutro, y se puso de nuevo a incubar a 37°C. Al día cinco se reviso en busca de cpe que en esta prueba se llama placa y se cuantifica como unidades formadoras de placa por ml (PFU/ml).

### **6.3.1 RT-PCR y Secuenciación**

El RNA viral fue extraído de un simple pasaje en cultivo de células Vero tomando directamente 140 $\mu$ L del sobrenadantes del cultivo infectado, usando QIAamp kit de extracción de RNA (QIAGEN Inc., Valencia, CA). Se llevo acabo la prueba de RT-PCR usando tres pares de primers para amplificar completamente los genes de la premembrana del virus (prM-E) utilizando Titan Single Step RT-PCR kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA).

Se preparo un gel de agarosa al 1% donde se corrió la muestra y el producto del PCR fue purificado del gel con el kit QIAquick (Quiagen,Valencia,CA,USA) de acuerdo con el protocolo de manufactura y la plantilla resultante fue directamente secuenciada con los primers de amplificación y así se hicieron las reacciones de secuenciación. El análisis y montaje de los datos de la secuenciación fueron hechos con el software Vector NTI suite (Informas, Frederick, MD, USA). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región de los genes prM-E del aislamiento fueron alineados con el programa AlinX en el Vector NTI suite y comparados con secuencias de aislamientos de WNV de Norteamérica, los cuales fueron disponibles en GenBank.

Árboles filogenéticos fueron construidos por análisis Bayesiano con el programa MARBAYES, versión 2.0 con la Metrópolis-coupled, Markov Caín, algoritmos Monte Carlo corrido con 4 cadenas sobre 150,000 generaciones bajo un modelo de tiempo-reversible con un quemado-a tiempo de 50,000 generaciones. La tasa de heterogeneidad fue estimada por el uso de una distribución  $\gamma$  por los sitios variables. Los árboles Bayesianos de consenso fueron comparados con árboles generados por neighbor-joining, parsimonia máxima, usando análisis PAUP, versión 4.0b10 para máxima probabilidad, y cada método genero árboles con la misma topología total. El filograma de consenso de 40 aislamientos de WNV fue generado por análisis Bayesiano, con valores confidentes al revelar nudos para demostrar soporte estadístico para cada clade.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Colecta de Mosquitos

Un total de 2,297 mosquitos, representando 4 géneros y 11 especies, fueron probados en 238 grupos (pools) que se colectaron durante el periodo del estudio, el cebo humano fue el método de colecta, por el cual se capturaron mas especimenes (40.3%), seguido del aspirado intradomiciliar (23.1%), trampas de luz con dióxido de carbono (21.8%), Aspirado en vegetación (7.9%) y emergencia en laboratorio (6.7%); del total de culícidos capturados el 61.8% fueron hembras y el 38.2% machos(Tabla I). La colecta se realizó en los Municipios de Guadalupe, Escobedo y Pesquería, N. L., México, durante el periodo de Junio 2003-Septiembre 2004.

TABLA I

Mosquitos culícidos capturados por los diferentes métodos de captura, los datos se presentan como numero de capturados y porcentaje de capturados

Método de Colecta	No. De Pools y %
<b>Cebo Humano</b>	96 (40.3%)
<b>Aspirado Intradomiciliar</b>	55 (23.1%)
<b>Trampas de Luz</b>	52 (21.8%)
<b>Aspirado En Vegetación</b>	19 (07.9%)
<b>Emergencia en Lab.</b>	16 (06.7%)
	<b>Total: 238 pools</b>

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

TABLA II

Mosquitos *Cx. quinquefasciatus* capturados por los diferentes métodos de captura, los datos se presentan como numero de capturados y porcentaje de capturados totales

n= 238

Método de Colecta	No. De Pools y %
<b>Cebo Humano</b>	19 (7.9%)
<b>Aspirado Intradomiciliar</b>	16 (6.7%)
<b>Trampas de Luz</b>	19(7.9%)
<b>Aspirado En Vegetación</b>	19 (07.9%)
<b>Emergencia en Lab.</b>	9 (3.8%)
	<b>Total: 82 (35.3%)</b>

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

TABLA III

Especies de mosquitos capturados en los Municipios de Guadalupe, Escobedo y Pesquería, N. L., México, los datos se presentan como especies capturadas

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

La especie mas colectada fue *Cx. quinquefasciatus* con 82 grupos de mosquitos (798 ejemplares), seguido de *Ps. ferox* con 70 con grupos, con 697 especimenes, y en tercer lugar se encuentra *Ae. aegypti* con 40 grupos (399 especimenes), las especies que

sólo tuvieron un grupo fueron *Ae. vexans*, *An. pseudopunctipennis* y *An. quadrimaculatus* Macquart, siendo esta última, en la que sólo se consiguieron 2 especímenes (Tabla IV).

TABLA IV

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

Genero y especie	No. De Pools	No. Mosquitos
<i>Aedes aegypti</i>	39	399
<i>Aedes vexans</i>	1	10
<i>Ochlerotatus taeniorynchus</i>	15	146
<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	1	8
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	1	2
<i>Culex coronator</i>	13	118
<i>Culex quinquefasciatus</i>	81	798
<i>Psorophora ciliata</i>	5	22
<i>Psorophora confinnis</i>	2	8
<i>Psorophora cyanescens</i>	9	89
<i>Psorophora ferox</i>	70	697
Total	238	2297

### 7.1.2 Mosquitos positivos

De 2,297 mosquitos colectados un simple pool compuesto por 10 mosquitos *Culex quinquefasciatus* los cuales fueron colectados el 10 de Junio del 2003, nos dio un aislamiento de WNV, designado como NL-54, el cual produjo CPE aproximadamente en el día 7. Este pool fue colectado en el Ejido Francisco Villa, en Pesquería, N. L. (Figura 4), y fue colectado por aspirado en vegetación; se identificó por medio de inmunofluorescencia, la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, el ensayo antigénico Vec Test y RT-PCR y se tituló por el método de Overlay y por este método resultado con  $10^2$  unidades formadoras de placa / mililitro.

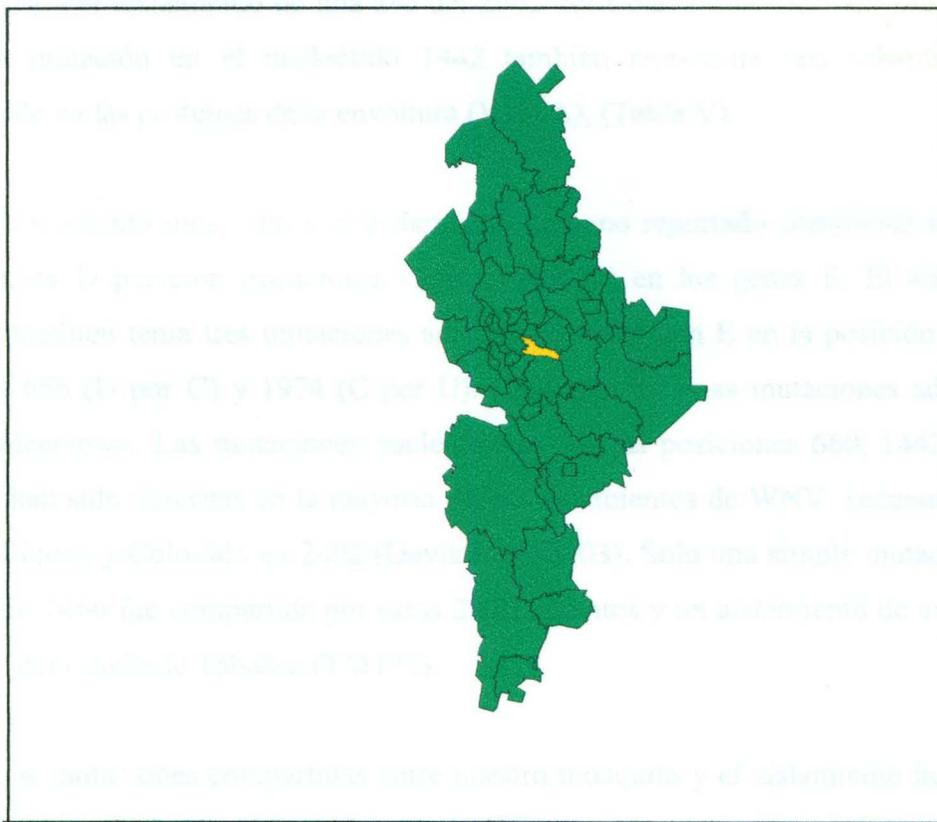


Figura 4. Municipio de colecta en el estado de Nuevo León, donde se aisló WNV de mosquitos *Culex quinquefasciatus*.

Se comparó este aislamiento denominado NL-54 (GenBank accession no. AY963775) con un aislamiento humano de Sonora (GenBank accesión no. AY963774), el prototípico aislamiento de WNV de Norteamérica WN-NY99 (GenBank accesión no.

AF196835), dos previos aislamientos Mexicanos MexNL-03 (GenBank accesión no. AY426741) (7) TM171-03 (GenBank accession no. AY371271) (2), y un aislamiento de el condado de Harris, Texas, en el 2002 (GenBank accession no. AY185906) (15) y encontramos diferencias en nucleótidos y aminoácidos y similitudes entre cada uno de los aislamientos.

El aislamiento del mosquito y el aislamiento humano de Sonora, comparten una mutación de nucleótido en la posición 660 (C por U) de los genes prM y dos mutaciones en la posición 1442 (U por C) 2466 (C por U) de los genes E. Cada una de estas tres mutaciones fue compartida con la cadena de un caballo en el 2003 de Nuevo León (MesNL-03) (7) y el aislamiento de una ave del 2002 del Condado de Harris, Texas (TX-1) (15). La mutación en el nucleótido 1442 también representa una substitución de aminoácido en las proteínas de la envoltura (V159A), (Tabla V).

El mosquito mexicano y el aislamiento humano reportado comparten una única mutación en la posición geonómica 1320 (A por G) en los genes E. El aislamiento humano también tenía tres mutaciones adicionales en el gen E en la posición 1074 (G por A), 1656 (U por C) y 1974 (C por U). Cada una de estas mutaciones adicionales fueron silenciosas. Las mutaciones nucleotídicas en las posiciones 660, 1442, y 2466 también han sido descritas en la mayoría de los aislamientos de WNV secuenciados de Texas, Illinois, y Colorado en 2002 (Davis *et al.* 2003). Solo una simple mutación en el nucleótido 2466 fue compartida por estos 2 aislamientos y un aislamiento de una ave en el 2003 del estado de Tabasco (TM171).

Las mutaciones compartidas entre nuestro mosquito y el aislamiento humano de Sonora, por análisis de los árboles construidos y representaron ser de una distinta subclade que es apoyado por fuertes valores confidentes Bayesianos (94%) (Figura 5).

TABLA V

Diferencias en Nucleótidos y aminoácidos en los genes de prM-E de aislamientos de México y Texas comparados la cadena de West Nile Virus WN-NY99 (382-99)

Cadena	Nucleotide (amino acid) substitutions in prM and E genes (ntds. 466-2469) <sup>a</sup>																		
	483	549	660	858	887	1074	1137	1179	1320	1356	1432	1442	1626	1656	1974	2328	2388	2392	2466
WN-NY99 (AF196835) <sup>b</sup>	C	U	C	C	U (Ile)	G	C	A	A	C	U (Ser)	U (Val)	C	U	C	C	C	G (Ala)	C
TM171-03 (AY371271)	U			U	C (Thr)		U				C (Pro)		U			U	U		U
MexNL-03 (AY426741)	<sup>x</sup>	C	U					G		U		C (Ala)							U
NL-54 (Mosquito-Nuevo León, MX)			U						G			C (Ala)							U
Human (Sonora, MX)			U			A			G			C (Ala)	C	U					U
Harris Co., TX-1 (AY185906)			U									C (Ala)						A (Thr)	U

<sup>a</sup>Número de nucleótido correspondiente a WN-NY99; las substituciones de aminoácidos están entre paréntesis

<sup>b</sup>Número de acceso en GenBank.

<sup>x</sup>Espacios vacíos indican que no hay substituciones en nucleótidos o aminoácidos.

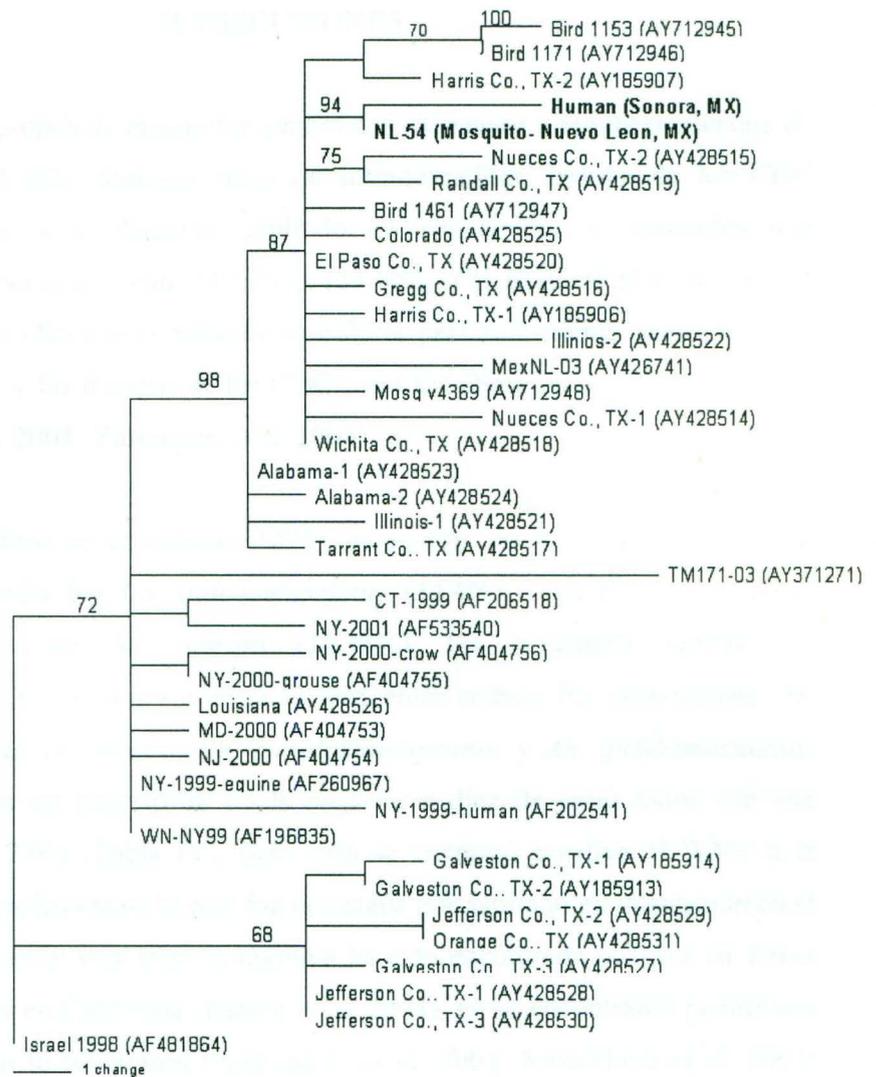


Figura 5. Filograma del aislamiento de WNV de un pool de mosquito y uno humano en México (en negritas). El árbol filogenético fue generado por análisis Bayesiano de la región nucleotídica de la prM y de genes E de 40 aislamientos hasta el 2004 y la cadena más estrechamente relacionada del Viejo mundo, Israel 1998. Los valores Bayesianos están mostrados para proveer soporte estadístico para cada clade.

## 8. DISCUSIONES

De los 238 grupos de mosquitos capturados, de mayor a menor porcentaje de capturas fueron: el cebo humano, aspirado intradomiciliar, trampa de luz CDC miniatura (luz blanca y oscura), aspirado en vegetación, y mosquitos que emergieron en laboratorio con (40.3%), (23.1%), (21.8%), (7.9%) y (6.7%) respectivamente, no obstante el método de colecta preferentemente utilizado es la trampa de gravedad, y las trampas de luz CDC con CO<sub>2</sub> (Nasci *et al.* 2001, Reisen *et al.* 2004; Tesh *et al.* 2004; Yaremych *et al.* 2004).

En este trabajo se colectaron 2297 mosquitos de los cuales, la especie mayormente capturada fue *Cx. quinquefasciatus* (34.4%), seguido por *Ps. ferox* (29.4%), posteriormente *Ae. aegypti* (16.38%), los siguientes fueron *Oc. taeniorhynchus*, y *Cx. coronator* con un 11.76% entre ambos; *Ps. cyanescens*, *Ps. ciliata*, *Ps. confinnis*, *Ae. vexans*, *An. pseudopunctipennis*, y *An. quadrimaculatus*, fueron especies con un número de pools menores a diez de entre todos con una representación del 7.9% (Tabla IV), pero solo se encontró positiva al WNV a la especie (*Cx. quinquefasciatus*) la cual fue colectada por aspirado en vegetación en el Municipio de Pesquería; esta especie también ha sido encontrada positiva en Texas (Tesh *et al.* 2004), y en California (Riesen *et al.* 2004); no se encontraron positivas a otras especies como lo reportaron (Andreadis *et al.* 2001; Kulasekera *et al.* 2001; Yaremich *et al.* 2004; Tesh *et al.* 2004), posiblemente porque el número de especímenes colectados fue reducido en comparación a los reportados por los autores anteriores.

Por otro lado, el pool de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* positivo al WNV, no perteneció, a los municipios del área metropolitana de Monterrey (urbanos), sino a uno suburbano, como fue Pesquería (30 Km. de Monterrey)

Al no encontrarse positivos los mosquitos que se colectaron en etapas inmaduras, y que emergieron en laboratorio (los de menor porcentaje colectados), no

fue posible demostrar la transmisión transovárica (vertical) del virus, pero la transmisión vertical, de este virus ha sido detectada en New York experimentalmente, en una tasa baja (0.14%) por Dohm *et al.* (2002).

Por otro lado, el 38.2% de los mosquitos totales fueron machos, pero también fueron negativos al virus, por lo que no se demuestra la posibilidad de transmisión por medio de inseminación (transmisión venérea) como lo ha demostrado Shroyer, (1990) que colocó a hembras de laboratorio de *Cx. quinquefasciatus* vírgenes con machos infectados del virus de encefalitis de San Luis (SLE), y encontró que entre 23 y 25% fueron infectadas con este virus, de estas el 58% fueron hembras inseminadas y el 23% fueron hembras vírgenes, lo que demostró que hubo transmisión vertical de este virus, además de transmisión venérea de machos a hembras.

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

Considerando que se encontró a 1 (0.42%) grupo de mosquitos hembras de *Cx. quinquefasciatus*, positivo al WNV esto podría convertirlo en un vector puente potencial importante del Virus del Oeste del Nilo en México; el porcentaje de positividad solo fue mayor al reportado por Andreadis *et al.* (2001) que encontraron el 0.15% de positividad en Connecticut, evaluando 9,085 grupos (137,199 mosquitos); Nasci *et al.* (2001) reportaron el 0.8% de positividad en New York y New Jersey, de 1, 853 grupos (32,814 mosquitos); Yaremych *et al.* (2004) encontraron de positividad el (3.36%) en Illinois, pero no separaron las especies de

*Culex*; el porcentaje mas alto lo reportaron Kulasekera, *et al.*(2001), y fue de 13.54% de 967 grupos (24,068 mosquitos) en New York. Los investigadores que colectaron a *Cx. quinquefasciatus*, fueron Tesh *et al.* (2004) que encontró el 3% de positividad en Texas, lo que es 400 grupos con WNV de 13,306 grupos (> 350,000mosquitos) de los cuales mas del 95% fueron esta especie, y Reisen *et al.*(2004) que encontraron una positividad del 1.54% (16 grupos de 1,036 grupos, y de los positivos 6 fueron de *Cx. quinquefasciatus*. Por otro lado cabe mencionar que faltan realizarse mas estudios para incriminar a este mosquito como vector en México, entre ellos estudios de laboratorio, por ejemplo calcular la tasa de infección, diseminación y transmisión del WNV para mosquitos, ya sea expuestos oralmente o por inoculación intratoracica, como los realizados por Turell *et al.* (2000), Sardelis *et al.* (2001), Goddard *et al.*(2002).

El aislamiento del mosquito y el aislamiento humano de Sonora, comparten una mutación de nucleótido en la posición 660 (C por U) de los genes prM y dos mutaciones en la posición 1442 (U por C) 2466 (C por U) de los genes E. Cada una de estas tres mutaciones fue compartida con la cadena de un caballo en el 2003 de Nuevo León (Mes-NL-03) y el aislamiento de una ave del 2002 del Condado de Harris, Texas (TX-1), así como Davis *et al.* (2004) al alinear las secuencias de 22 aislamientos y ser comparadas con la secuencia prototipo WNV-NY 99 encontraron mutaciones nucleotidicas ocurridas en 33 posiciones (9 en la premembrana: prM y 24 en la envoltura E). En este aislamiento se encontró una mutación en el nucleótido 1442 que represento una substitución de aminoácido en las proteínas de la envoltura una valina de WNV-NY 99 por una Alanina (V159A). De igual manera Davis *et al.* (2004) encontró en sus aislamientos un total de siete substituciones de aminoácidos (2 en prM, y 5 en E).

Las mutaciones nucleotídicas en las posiciones 660, 1442, y 2466 también han sido descritas en la mayoría de los aislamientos de WNV como los que han sido secuenciados por Davis, *et al.* de Texas, Illinois, y Colorado en 2002. Solo una simple mutación en el nucleótido 2466 fue compartida por estos 2 aislamientos y un aislamiento de una ave en el 2003 del estado de Tabasco (TM171).

## 9. CONCLUSIONES

De los métodos de colecta con mayores porcentajes de capturas fueron el cebo humano (40.3%), y el aspirado intradomiciliar (23.1%), después la trampa de luz CDC miniatura (luz blanca y oscura) (21.8%). Un porcentaje menor de captura se obtuvo por medio de aspirado en vegetación (8%), mas sin embargo por este método se capturaron los mosquitos que fueron positivos a WNV.

Para el aislamiento de WNV, se utilizó el método de inoculación de los sobrenadantes de los pools macerados de mosquitos sobre frascos con células vero y de aquí llevamos acabo en el cultivo que tubo CPE las pruebas de inmunofluorescencia indirecta, prueba de la inhibición de la hemoaglutinación (HI), ensayo antigénico Vec Test WNV/SLE (Medical Analysis Systems, Camarillo, CA) y RT-PCR en donde por todas estas pruebas el WNV se identifico en el pool positivo.

Al no encontrar positivos al WNV a mosquitos que emergieron en laboratorio, ni a machos, no se determinó que hubiese una transmisión transovárica, ni la posibilidad de transmisión venérea, así mismo las especie que tuvo el mayor porcentaje de abundancia fue *Cx. quinquefasciatus*, seguido por *Ps. ferox*, *Ae. aegypti*, *Oc. taeniorhynchus*, y *Cx. coronator*, pero solo la primera especie resultó positiva al WNV lo que sugiere que esta especie es el vector del Virus del Oeste del Nilo en el noreste de México.

Este aislamiento del virus de mosquitos y el aislamiento humano de Sonora comparten una única mutación en la posición geonómica 1320 (A por G) en los genes E. El aislamiento humano también tuvo tres mutaciones adicionales en el gen E en la posición 1074 (G por A), 1656 (U por C) y 1974 (C por U). Cada una de estas mutaciones adicionales fueron silenciosas. Las mutaciones nucleotidicas en las posiciones 660, 1442, y 2466 también han sido descritas en la mayoría de los aislamientos de WNV secuenciados de Texas, Illinois, y Colorado en 2002. Esta

conclusión sugiere que los aislamientos obtenidos de los estados del Norte de México (Nuevo León y Sonora), fueron derivados de cadenas de WNV circulantes en el Oeste de los Estados Unidos. Solo una simple mutación en el nucleótido 2466 fue compartida por estos 2 aislamientos y un aislamiento de una ave en el 2003 del estado de Tabasco (TM171). Esta conclusión apoya el resultado de estudios anteriores que sugieren una introducción separada de WNV dentro de México.

Los árboles filogenéticos generados indican que el aislamiento del mosquito y el aislamiento humano pertenecen a la clade comprendida de aislamientos de WNV colectados fuera del Noreste de los Estados Unidos después del 2001, con excepción de los aislamientos colectados a lo largo de la Costa Sur de Texas. Estos aislamientos constituyen una separada, clade hermana relativa a todos los otros aislamientos de WNV de Norteamérica secuenciados hasta la fecha.

La acumulación de las tres adicionales mutaciones de nucleótidos en el aislamiento humano del 2004 de México es ilustrado por una larga rama en comparación del mosquito del 2003 aislamiento NL-54, lo cual sugiere la continua micro evolución del WNV en México año tras año.

El aislamiento de WNV de un pool de *Culex quinquefasciatus* representa el primer caso reportado y confirmado en este vector en México. La escasez de casos humanos reportados a la fecha en México es curiosa por varias razones: 1) El gran número de casos reportados en los Estados Unidos, 2) evidencia disponible indica que WNV esta ampliamente distribuido en México. La mayoría de las cadenas de WNV circulantes en México son genéticamente similares que los de Estados Unidos. Una explicación de estas diferencias podría ser la falla del personal de las instituciones de salud locales para reconocer formas clínicas de la infección del WNV. Como lo ilustrado por el paciente, la fiebre producida por WNV puede ser fácilmente confundida con fiebre de dengue. Una segunda razón puede ser la dificultad de hacer diagnostico serológico de la infección de WNV entre personas viviendo regiones geográficas donde varios diferentes flavivirus circulan y las personas tienen múltiples infecciones por flavivirus. La tercera y relacionada posibilidad es que la infección de WNV puede ser menos severa en personas con anticuerpos heterologos preexistentes en contra de otros flavivirus.

## 10. LITERATURA CITADA

- Andreadis, T. G., J. F. Anderson, & C. R. Vossbrinck. 2001. Mosquito surveillance for West Nile virus in Connecticut, 2000: Isolation from *Culex pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarius* and *Culiseta melanura*. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (4): 670-674.
- Bernard, K. A., J. G. Maffei, S. A. Jones, E. B. Kauffman, G. D. Ebel, A. P. Dupuis II, K. A. Ngo, D. C. Nicholas, D. M. Young, P. Y. Shi, V. L. Kulasekera, M. Eidson, D. J. White, W. B. Stone, NY State West Nile virus surveillance team and L. D. Kramer. 2001. West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York state, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (4): 679-685
- Blitvich, B. J., I. Fernández- Salas, J. F. Contreras-Cordero, N. L. Marlenee, J. I. González-Rojas, N. Komar, et al 2003. Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Horses, Coahuila State, México. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (7): 853-856.
- Blitvich, B. J., I. Fernández- Salas, J. F. Contreras-Cordero, M. A. Lorono-Pino, N. L. Marlenee, F.J. Díaz, J. I. González-Rojas, N. Obregón-Martinez, J. A. Chiu-García, W. C. Black IV & B. J. Beaty. 2004. Phylogenetic Analysis of West Nile Virus, Nuevo León State, México. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 1314-1317.
- Campbell, G. L., A. A. Marfin, R. S. Lanciotti, D. J. Gubler. 2002 West Nile virus. *Lancet Infect Dis.* 2:519-29.
- Davis CT, Beasley DCW, Guzman H, Raj P, D'Anton M, Novak RJ, *et al.* Genetic variation among temporally and geographically distinct West Nile virus isolates collected in the United States, 2001 and 2002. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:1423-9.
- Dohm, D. J., & M. J. Turell. 2001. Effect of incubation at overwintering temperatures on the replication of West Nile virus in New York *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. med. Entomol.* 38(3): 462-464.
- Dohm, D. J., M. L. O'guinn, & M. J. Turell. 2002a. Effect of environmental temperatura on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *J. Med. Entomol.* 39 (1): 221-225.
- Dohm, D. J., M. R. Sardelis, & M. J. Turell. 2002b. Experimental vertical transmisión of West Nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 39 (4): 640-644.

- Fernández S., I. 1999. *Biología y Control de Aedes aegypti*. Manual de Operaciones. Editorial Universidad Autonoma de Nuevo León., México
- Fernández- Salas, I., J. F. Contreras-Cordero, B. Blitvich, J. I. González-Rojas, A. Cavazos -Álvarez , N. L. Marlenee, A. Elizondo-Quiroga, M. A. Lorono-Pino, D. J. Gubler, B. C. Cropp, C. H. Calisher & B. J. Beaty. 2003. Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Birds, Tamaulipas State, México. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 3: 209-213.
- Goddard, L. B., A. E. Roth, W. K. Reisen & T. W. Scott. 2002. Vector Competence of California Mosquitoes for West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1385-1391.
- Hurlbut, H. S. 1973. The effect of environmental temperature upon the transmission of St. Louis encephalitis virus by *Culex pipiens quinquefasciatus*. *J. med. Entomol.* 10 (1): 1-1
- Lillibridge, K.M. Parsons,R., Randle,Y., Travassos Da Rosa, A. Guzman, H., Siirin, M., Wuithiranyagool, T., Hailey,C., Higgs,S., Bala, A.A., Pascua, R., Meyer,T., Vanlandingham, D.L., And Tesh,R.B.. 2004. The 2002 introduction of west Nile virus into Harris county, Texas, an area historically endemic for St. Louis Encephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70(6), 2004, pp. 676-681
- Kulasekera, V. L., L. Kramer, R. S. Nasci, F. Mostashari, B. Cherry, S. C. Trock, C. Glaser and J. R. Miller. 2001. West nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 7(4): 722-725.
- Komar, N. 2003. West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res.* 61:185-234.
- Lanciotti,R. S., Ebel G. D., Deubel V., Kerst A.J. , Murri S. , Meyer R., Rowen M., Mckinney N. , Morrill W. E. , Crabtree M. B. , Kramer L. D. ; Roehrig J. T.2002. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology.* 298(1):96-105.
- Nasci, R. S., D. J. White, H. Stirling, J. Oliver, T. J. Daniels, R. C. Falco, S. Campbell, W. J. Crans, H. M. Savage, R. S. Lanciotti, C. G. Moore, M. S. Godsey, K. L. Gottfried, & C. J. Mitchell. 2001. West Nile virus isolates from mosquitoes in New York and New Jersey, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* 7(4): 626-630.
- Nasci RS, Savage HM, White DF, Miller JR, Cropp BC, Godsey MS, *et al.* West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001;7

- Nasci, R. S, Komar, N., Marfin, A.A., Ludwig, G.V., Kramer, L.D., Daniels, T.J., Falco, R.C., Campbell, S.R., Brookes, K., Gottfried, K.L., Burkhalter, K.L., Aspen, S.E., Kerst, A.J., Lanciotti, R.S., and C.G. Moore. 2002. Detection of West Nile virus-infected mosquitoes and seropositive juvenile birds in the vicinity of virus-positive dead birds. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol 67, Issue 5, 492-496
- Nasci, R. S., K. L. Gottfried, K. L. Burkhalter, V. L. Kulasekera, A. J. Lambert, R. S. Lanciotti, A. R. Hunt, & J. R. Ryan. 2002. Comparison of vero cell plaque assay, Taq Man<sup>®</sup>, reverse transcriptase polymerase chain reaction RNA assay, and Vectest<sup>™</sup>, antigen assay for detection of West Nile virus in field-collected mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 18 (4): 294-300.
- PAHO. 2001. Virus del Nilo Occidental en las Américas 2001 (En Línea) Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/sha/be-v2In4-nilo.htm> (2002, Enero, 10)
- Petersen, L. R., & J. T. Roehrig. 2001. West Nile virus: A reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 7(4): 611-614.
- Rappole, J. H, S. R. Derrickson, & Z. Hubalek. 2000. Migratory birds and spread of **West Nile virus** in the **Western Hemisphere**. *Emerg Infect Dis.* 6:319-28.
- Reisen, W. K., H. Lothrop, R. Chiles, M. Madon, C. Cossen, L. Woods, S. Husted, V. Kramer & J. Edman. 2004. West Nile Virus in California. *Emerg. Infect. Dis.* 10(8): 1369- 1377.
- Sardelis, M. R., M. J. Turell, D. J. Dohm, and M. L. O'Guinn. 2001. Vector competence of selected North American *Culex* and *Coquilletidia* mosquitoes for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (6): 1018- 1022.
- Shroyer, D. A. 1990. Venereal Transmission of St. Louis Encephalitis virus by *Culex quinquefasciatus* males (Diptera: Culicidae). *J. med. Entomol.* 27 (3): 334- 337.
- Tesh, R. B., R. Parson, M. Siirin, Y. Randle, C. Sargent, H. Guzman, T. Wuithiranyagool, S. Higgs, D. L. Vanladingham, A. A. Bala, K. Haas, and B. Zerinque. 2004. Year-round West Nile virus activity, Gulf coast region, Texas and Louisiana. *Emerg. infect. Dis.* 10 (9): 1649-1652.
- Turell, M. J., M. O'Guinn & J. Oliver. 2000. Potential of New York Mosquitoes to Transmit West Nile Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 413- 414.
- X.Y. Jia, T. Briese, I. Jordan, A. Rambaut, H. C. Chi, J. S. Mackenzie, R. A. Hall, J. Scherret, W. I. Lipkin 1999. Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *Lancet.* 354: 1971-1972
- Yaremych, S. A., R. E. WRNAer, P. C. Mankin, J. D. Brawn, A. Raim, and R. Novak. 2004. West Nile virus and high deathrate in American crow. *Emerg. Infect. Dis.* 10(4):709-.

www.data.nl.gob.mx/Geografia/CartoBasica/NuevoLeon/Ecologicas. Fuente:  
Anuario Estadístico 2002 Nuevo León, SAGARPA.

RESUMEN EJECUTIVO

## **RESUMEN CURRICULAR**

Darwin Eduardo Elizondo Quiroga

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Etimología Médica

**Tesis:** ANALISIS LONGITUDINAL DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN AVES, EQUINOS Y MOSQUITOS DEL NORESTE DE MÉXICO (2001-2004)

Campo de Estudio: Entomología Médica.

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 18 de Septiembre de 1976, hijo de Armando Elizondo Garza y Sonia Quiroga González.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Biólogo en 2001.

Experiencia profesional: Asistente de investigación en el Departamento de Entomología Medica de la Facultad de Biología desde 2000, Estancia de Investigación en Universty of Texas Medical Branch en Galveston, Texas, EUA, Septiembre 2004 a Diciembre del 2005.