



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**DETECCIÓN DE LA CIRCULACIÓN DEL VIRUS DEL
OESTE DEL NILO EN CABALLOS DE TIZIMÍN Y
PANABÁ, YUCATÁN, MÉXICO**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR:

Médico Veterinario Zootecnista

José Emigdio Ortiz Esquivel

Asesores:

Dr. José Alberto Rosado Aguilar

Dr. Roger Iván Rodríguez Vivas

MIBB. Fernando Isaías Puerto Manzano



POSGRADO INSTITUCIONAL
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES

Mérida, Yuc., México, Junio de 2019



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS NATURALES TROPICALES**

**ALUMNO: MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
JOSÉ EMIGDIO ORTIZ ESQUIVEL**

SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

**DRA. KARLA Y. ACOSTA VIANA
CIR-HIDEYO NOGUCHI**

**M. EN C. MARCO ANTONIO TORRES CASTRO
CIR-HIDEYO NOGUCHI**

**DR. EDWIN GUTIÉRREZ RUIZ
CCBA-UADY**

**DR. JOSÉ ALBERTO ERALES VILLAMIL
CCBA-UADY**

**DR. MANUEL BOLIO GONZÁLEZ
CCBA-UADY**

MÉRIDA, YUCATÁN, AGOSTO DEL 2019

DECLARACIÓN

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título de grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se ubican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se identifique la fuente.

MVZ. José Emigdio Ortiz Esquivel

DEDICATORIA

A mis padres José Luis Ortiz y Marcelina Esquivel, quienes no solo me han dado la vida sino todo lo que he necesitado para vivirla lo mejor posible.

A mi hermana Judit Ortiz Esquivel, por ser mi constante compañera desde el momento en que llegó hasta este mundo.

A Dios y a la vida, por estar aquí.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca de posgrado que me permitió cursar mis estudios de Maestría en Ciencias Agropecuarias.

A mis asesores: Dr. José Alberto Rosado Aguilar, Dr. Roger Iván Rodríguez Vivas y Dr. Fernando Isaías Puerto Manzano, por su confianza, apoyo y asesoramiento para la elaboración de esta tesis. Sin su ayuda nada hubiera sido posible.

A mis tutores: Dr. Edwin José Gutiérrez Ruiz, M. en C. Marco Torres Castro y M. en C. Alejandro Alzina López, por su confianza, aportación crítica y constructiva para la realización de esta tesis, pero sobre todo por su amistad.

Al MVZ. Arturo Bates Acosta, quien brindó toda la ayuda y las facilidades para el muestreo en los 23 ranchos de Tizimín, en los cuales se realizó este estudio.

A la QFB. Sandra Villegas Pérez, por otorgar amablemente su tiempo y ayuda para la realización de las pruebas en esta tesis.

Un agradecimiento especial al personal del Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes del CIR-UADY, en especial al IBQ. Henry Noh Pech y al QFB. Raúl Tello Martín quienes me ayudaron, guiaron y asesoraron para la realización de mi tesis. De igual manera agradezco a todos los estudiantes de LEER con quienes pasé tantos momentos agradables, por su ayuda y amistad.

A María Fernanda Anguiano de Lara, por su amor, cariño y apoyo para motivarme siempre a seguir adelante y no rendirme.

A mis compañeros de estudio, amigos y colegas: M. en C. Omar Castillo Trujillo, M. en C. Gladys Noh Cuxim, M. en C. Monserrat Cob Garma, M. en C. Gabriela Flota Burgos, M. en C. Perla Velázquez Delgado, M. en C. Eduardo Ávalos Borges y M. en C. Eduardo Ramos Bruno, con quienes he pasado tantos buenos momentos y fueron un gran apoyo para concluir con esta etapa de mi vida.

RESUMEN

El Virus del Oeste del Nilo (VON) es un *flavivirus* ampliamente distribuido a nivel mundial. Las aves silvestres son hospederos amplificadores del virus y los mosquitos del género *Culex* son los vectores. Los seres humanos y los caballos son hospederos finales y accidentales. En Yucatán, México se han reportado en caballos bajas prevalencias de anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) específicos para VON y la presencia del virus en aves silvestres. El objetivo de este trabajo fue determinar la circulación del VON en caballos de Tizimín y Panabá, Yucatán, México. Por conveniencia se estudiaron 184 caballos de 23 unidades de producción en dos municipios de Yucatán. De cada caballo se obtuvo sangre de la vena yugular. Los sueros obtenidos fueron analizados con una prueba de ELISA de captura para detectar inmunoglobulina M (IgM) específico para VON. Las muestras seropositivas fueron analizadas por Retrotranscripción y después Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR por sus siglas en inglés, *reverse transcription polymerase chain reaction*) para detectar el ARN viral de VON. De los 184 caballos estudiados, 8 fueron seropositivos (IgM) y dos sospechosos, teniendo una frecuencia del 4.3% de seropositivos. Las muestras seropositivas a IgM resultaron negativas a la prueba de prueba de RT-PCR, lo que indica infecciones recientes con VON y no presentes durante el muestreo. Se concluye que la detección de IgM contra VON demuestra infecciones recientes con el virus e indica su circulación en caballos de Tizimín y Panabá, Yucatán, México.

Palabras clave: Caballos, Virus del Oeste del Nilo, frecuencia, ELISA, IgM.

ABSTRACT

The West Nile Virus (WNV) is a *flavivirus* widely distributed worldwide. Wild birds are hosts that amplify the virus and mosquitoes of the genus *Culex* are the vectors. Humans and horses are final and accidental hosts. In Yucatan, Mexico, prevalence of immunoglobulin G (IgG) antibodies specific to VON and the presence of the virus in wild birds have been reported in horses. The objective of this work was to determine the circulation of VON in horses from Tizimín and Panabá, Yucatán, México. For convenience, 184 horses of 23 production units in two municipalities of Yucatan were studied. Blood from the jugular vein from each horse was obtained. The sera obtained were analyzed by a capture ELISA test to detect immunoglobulin M (IgM) against VON. The seropositive samples were analyzed by a Retrotranscription Polymerase Chain Reaction test (RT-PCR) to detect VON. Of the 184 studied horses, 8 were seropositive (IgM) to VON and two suspects, with a frequency of 4.3% of seropositive. IgM seropositive samples were negative for the RT-PCR test, indicating recent infections with VON and not present during the sampling. It is concluded that the detection of IgM against VON in horses shows recent infections with the virus and indicates their circulation in Tizimín and Panabá, Yucatán, México.

Key words: Horses, WNV, frequency, ELISA, IgM.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 2 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. ESTRUCTURA DEL VON Y GENOMA VIRAL..... | 4 |
| 2.2. ECOLOGÍA Y CICLOS DE TRANSMISIÓN DEL VON..... | 5 |
| 2.3. VECTORES BIOLÓGICOS Y TRANSMISIÓN DEL VON..... | 7 |
| 2.4. EPIDEMIOLOGÍA DEL VON..... | 8 |
| 2.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES RECIENTES POR VON | 10 |
| 2.6. DISTRIBUCIÓN DEL VON EN AMÉRICA DEL NORTE | 12 |
| 2.7. DISTRIBUCIÓN DEL VON EN MÉXICO | 13 |
| 2.8. IMPORTANCIA DE LOS CABALLOS DOMÉSTICOS EN MÉXICO..... | 15 |
| 2.9. IMPORTANCIA DE LOS CABALLOS EN EL CICLO EPIDEMIOLÓGICO DEL VON | 16 |
| 2.10. DINÁMICA DE INFECCIÓN DE VON Y RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN CABALLOS | 17 |
| III. HIPÓTESIS..... | 19 |
| IV. OBJETIVO GENERAL..... | 19 |
| 4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| V. REFERENCIAS..... | 20 |
| VI. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN..... | 27 |
| AGRADECIMIENTOS | 27 |
| ABSTRACT..... | 29 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 30 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 2.3. Toma de muestras. | 31 |
| 2.5. Detección de anticuerpos inmunoglobulina M (IgM) específicos contra VON mediante la prueba de ELISA de captura (MAC)..... | 32 |
| 2.6. Detección del fragmento de genoma de VON por prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa por Retrotranscripción (RT-PCR) en punto final..... | 32 |
| 3. RESULTADOS..... | 33 |
| 4. DISCUSIÓN | 36 |
| 5. REFERENCIAS | 42 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURA 1. CICLOS DE TRANSMISIÓN DEL VON 6

FIGURA 2. ESQUEMATIZACIÓN DE LA DINÁMICA DE INFECCIÓN CON VON Y PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN CABALLOS 17

FIGURAS DEL ARTÍCULO

FIGURA 1. ESQUEMATIZACIÓN DE LA REGIÓN DE TIZIMÍN (MÉXICO), EN LA QUE SE REALIZARON LOS MUESTREOS PARA EL PRESENTE ESTUDIO 35

FIGURA 2. RESULTADOS DE LAS REACCIONES DE RT-PCR, VISUALIZADAS EN GEL DE AGAROSA, POSTERIOR A ELECTROFORESIS..... 35

CUADRO DEL ARTÍCULO

CUADRO 1. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS POSITIVAS Y SOSPECHOSAS A IGM (MAC-ELISA) CONTRA EL VON EN CABALLOS LOS MUNICIPIOS DE TIZIMÍN Y PANABÁ, YUCATÁN 34

I. INTRODUCCIÓN

El Virus del Oeste del Nilo (VON) es un *flavivirus* ampliamente distribuido a nivel mundial (Chancey et al., 2015; Mentoor et al., 2016; Sayed-Ahmed, 2016). Los mosquitos del género *Culex* son los vectores y las aves silvestres actúan como hospederos amplificadores del virus. Los seres humanos y los equinos son hospederos finales y accidentales, en los cuales las manifestaciones clínicas van desde enfermedad asintomática hasta la encefalitis (David y Abraham 2016; Loza-Rubio et al., 2016).

El diagnóstico de infecciones recientes por VON, por medio de la detección de ARN viral o IgM específicas para el virus en suero sanguíneo, se han empleado para la determinación de la circulación de cepas de VON en animales susceptibles de regiones geográficas que presenten las condiciones necesarias para su mantenimiento en vida silvestre (Pérez-Ruiz et al., 2011; García-Ruiz et al., 2016), lo que permite anticiparse ante posibles brotes en los seres humanos y animales domésticos como los equinos (CDC, 2013a). Los caballos se infectan con VON en los trópicos, pudiendo actuar como centinelas en el monitoreo de la transmisión del virus a los seres humanos en ausencia de programas de vigilancia ambiental (García-Bocanegra et al., 2012; CDC, 2013a).

En México, los primeros reportes del VON se hicieron en el 2002 en caballos con encefalitis en Coahuila, Tamaulipas y Chihuahua (Estrada-Franco et al., 2003). En México se ha reportado un número bajo de casos de enfermedad en seres humanos, caballos y aves, principalmente desde la frontera norte con los Estados Unidos de América (EUA) (Chancey et al., 2015). En 2003, se reporta por primera vez en Yucatán caballos reactivos a IgG contra VON (Loroño-Pino et al., 2003). En 2010, Loroño-Pino et al. (2010) estimaron que el 15% de los caballos en el oriente de Yucatán presentan anticuerpos IgG contra al VON. Recientemente, Chaves et al. (2016) utilizaron la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa por Retrotranscripción (RT-PCR, por sus siglas en inglés) y estimaron la frecuencia de VON del 6 a 27% de las aves estudiadas. A pesar de estos estudios, no se ha detectado la presencia de caballos serológicamente positivos a anticuerpos IgM, lo que pueden ser un indicador de infección reciente del virus en los caballos y el posible riesgo de

transmisión vectorial a otros hospederos. El objetivo de este trabajo fue determinar la circulación del VON en caballos de Tizimín y Panabá, Yucatán, México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Estructura del VON y genoma viral

El VON pertenece al género *flavivirus*, de la familia *Flaviviridae* y es un miembro del sero-complejo de encefalitis japonesa, que también incluye el virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de St. Louis, virus Rocío, virus de la encefalitis del Valle Murray, virus Usutu, virus Kunjin, virus Kokobera, virus Stratford y virus Alfuy (Colpitts et al., 2012; King et al., 2012; Lwande et al., 2014; Chancey et al., 2015).

El VON tiene un virión icosaédrico envuelto con 50 nm de diámetro, que contiene una cadena sencilla de ARN en polaridad positiva, de aproximadamente 11 kb de longitud compuesto de 10 genes flanqueados por las regiones no codificantes (NCR) 5' y 3', sin la cola de poliadenilación en el extremo 3' que tienen todos los demás virus de ARN. El genoma viral consiste en un solo marco de lectura abierto que codifica una única poliproteína, la cual después de la traducción es fragmentada (mediante proteasas celulares y virales) en 3 proteínas estructurales (PS): la cápside (C); Pre M/ membrana (prM/M); y la envoltura (E); y en 7 proteínas no estructurales (NS): proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Sotelo et al., 2009; Pérez-Ruiz et al., 2011; Colpitts et al., 2012; King et al., 2012; Lwande et al., 2014; Chancey et al., 2015).

La nucleocápside está compuesta por proteína C, que se asocia con el genoma de ARN y regula el ensamblaje viral. La proteína E de la envoltura del VON, interviene en la interacción del virus con las células del hospedero, regulando la unión del receptor en la superficie celular para la entrada viral y la fusión con la membrana de la célula hospedero, de igual manera, también induce la respuesta inmune del hospedero y es una de las proteínas estructurales más importantes inmunológicamente del virus (Colpitts et al., 2012; Chancey et al., 2015). La infección que ocurre en hospederos mamíferos induce respuestas inmunes innata y adaptativa, siendo esta última comúnmente medida por la detección de inmunoglobulinas (Ig) M y G (Sule et al., 2015).

Se han propuesto hasta cinco linajes genéticos distintos con base en los análisis filogenéticos de los virus aislados y publicados (Ozkul et al., 2013; Lwande et al., 2014;

Chancey et al., 2015; Mentoor et al., 2016). Los Linajes 1, 2, y 5 de VON se han asociado con brotes importantes en los seres humanos y animales domésticos como los caballos (Ozkul et al., 2013; Chancey et al., 2015; Mentoor et al., 2016). El Linaje 1 se distribuye ampliamente en todo el mundo y consiste en dos subtipos: 1a y 1b. El subtipo 1a incluye los aislados procedentes de África, Europa, Oriente Medio, Asia y América (Ozkul et al., 2013; Lwande et al., 2014; Chancey et al., 2015). El subtipo 1b está representado por el virus Kunjin (KUNV) australiano (Lwande et al., 2014; Chancey et al., 2015).

Los aislados del linaje 2 de VON, son históricamente endémicos de África, al sur de Sahara y en Madagascar, y han causado brotes esporádicos zoonóticos en Sudáfrica (Lwande et al., 2014; Chancey et al., 2015; Mentoor et al., 2016). Por su parte, el linaje 3 del VON únicamente tiene la capacidad de infectar células de mosquitos (Lwande et al., 2014; Chancey et al., 2015). El linaje 4 comprende los virus circulantes en Rusia desde 1988, incluyendo un aislado de garrapata del sur-oeste del Cáucaso y de aislamientos de mosquitos y reptiles (Lwande et al., 2014; Chancey et al., 2015). El linaje 5, anteriormente considerado subtipo 1c, incluye aislados de la India desde 1955 hasta el presente (Chancey et al., 2015).

2.2. Ecología y ciclos de transmisión del VON

De manera natural, el VON tiene dos ciclos diferentes de transmisión: 1) un ciclo enzoótico (selvático) primario o ciclo de amplificación que envuelve un grupo de vectores biológicos (mosquitos *Culex*) y hospederos aviares silvestres (reservorios); 2) un ciclo secundario que involucra distintos tipos de artrópodos y transmisión a otros hospederos como seres humanos y caballos (figura 1), en los que puede producir enfermedad grave y muerte (Sotelo et al., 2009; Ozkul et al., 2013; Chancey et al., 2015; Sule et al., 2015).

Existen muchos hospederos vertebrados distintos de las aves, tales como reptiles, anfibios y mamíferos que son susceptibles de infección por el linaje 1 de VON (Sayed-Ahmed, 2016).

En el ciclo de transmisión primario, los mosquitos ornitofílicos se alimentan de aves con viremia (hospederos amplificadores), por lo que llegan a adquirir al virus y posteriormente lo transmiten al alimentarse de otros hospederos. Si se presentan las condiciones apropiadas

(como temperatura (>38°C), especies y densidad poblacional de mosquitos, óptimo número de hospederos susceptibles, etc.) ocurrirá una epizootia en la población aviar (Colpitts et al., 2012; Chancey et al., 2015).

En algunos casos, puede producirse un desbordamiento del ciclo enzoótico, lo que provoca un foco zoonótico, afectando a las aves sinantrópicas, caballos y seres humanos. La exposición humana a los mosquitos infectados está influenciada por múltiples factores, incluyendo cambios en la proximidad de las poblaciones humanas a los mosquitos y las especies de aves hospederos, como puede ocurrir en zonas selváticas de regiones tropicales (EPA, 2016; USDA, 2018).

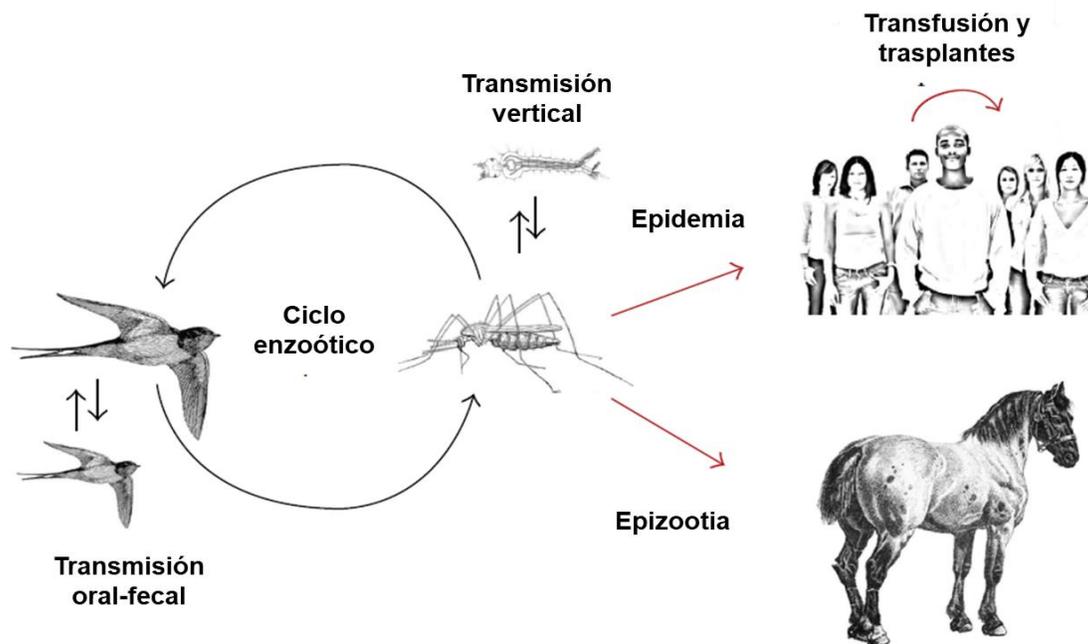


Figura 1. Ciclos de transmisión del VON: amplificación enzoótica (ciclo enzoótico) por aves y mosquitos, complementados por la transmisión de aves a aves. La transmisión vertical (transovárica) por mosquitos proporciona el mecanismo de la hibernación del virus. Los seres humanos y los caballos se cuentan como hospederos finales accidentales. La transmisión entre personas es a través de transfusión sanguínea, trasplante de órganos, lactancia y transuterina. Modificada de: Chancey et al., 2015.

Las aves son reservorios porque desarrollan una viremia suficientemente alta (aproximadamente 10^4 a 10^5 PFU / ml) como para infectar mosquitos (Sayed- Ahmed, 2016). Las aves migratorias que resisten la infección (como algunas del género de *Passeriformes*) (Conover y Vail, 2015), son capaces de conservar niveles altos del virus en sangre manteniendo un ciclo enzoótico, haciendo posible su dispersión entre diversas regiones geográficas, como acontece en todo el continente americano, donde existen las condiciones necesarias para su multiplicación durante todo el año (Pérez-Ruiz et al., 2011; Soler-Tovar y Vera, 2011; Chancey et al., 2015).

2.3. Vectores biológicos y transmisión del VON

Los mosquitos hembra del género *Culex* son los vectores biológicos primarios para la transmisión natural del virus. Después de que un mosquito se alimenta de sangre de un hospedero competente infectado (virémico), el arbovirus se replica dentro del mosquito y luego se puede transmitir a un hospedero susceptible a través de las secreciones de las glándulas salivales (Ozkul et al., 2013; Chancey, 2015; Sule et al., 2015). Los mosquitos se infectan al succionar la sangre con virus circulantes (aproximadamente 10^4 a 10^5 PFU / ml). Numerosos informes demuestran que el VON persiste en los órganos de las aves, en una forma tal que permite la retransmisión a los mosquitos vectores después del período de viremia inicial (Pérez-Ruiz et al., 2011; Sayed- Ahmed, 2016).

El virus puede ser transmitido por una variedad de mosquitos con diferentes preferencias por tipo de hospedero, con hasta 45 especies y 8 géneros notificados en América del Norte (Chancey et al., 2015). Los mosquitos del género *Culex* se consideran los vectores más importantes para la transmisión en América del Norte, Europa, Australia y Sudáfrica, por lo que en este género se han hecho el mayor número de aislamientos de VON en el mundo. En América del Norte, se distinguen como especies más importantes de transmisión mosquito-ave-mosquito a *Culex pipiens*, *Culex tarsalis*, *Culex nigripalpus*, *Culex restuans* y *Culex quinquefasciatus*. Los mosquitos que se alimentan de las aves y los mamíferos actúan como un "puente" entre un reservorio infectado (aves) y hospederos incidentales (mamíferos), como los del género *Aedes*, también relacionados como vector biológico en el ciclo de transmisión. Además, se distinguen otras especies como puentes entre aves y mamíferos,

como: *Ochlerotatus dorsalis*, *Aedes vexans* y *Culiseta inornata*. Los mosquitos ornitofílicos normalmente no juegan un papel en la transmisión del virus a los seres humanos (Kilpatrick, 2011; Chancey et al., 2015). Sin embargo, estudios que han integrado la abundancia, prevalencia de infección, patrones de alimentación y competencia de vectores, indican que *C. pipiens* y *C. restuans* consumen con frecuencia (15%) sangre en humanos y pueden ser responsables de la mayoría de las infecciones humanas en diversas regiones (Kilpatrick, 2011). En Yucatán se ha descrito una amplia distribución de especies de mosquitos que fungen como vectores biológicos para arbovirus como el VON; incluyendo algunas especies del género *Culex* que pueden estar presentes en zonas selváticas y peri domésticas (Dzul-Manzanilla et al., 2010).

El VON también puede ser transmitido directamente si las aves o mosquitos infectados son consumidos por los hospederos susceptibles o si estos últimos llegan a estar en contacto directo con fluidos cloacales u orales de otras aves con viremia alta (Pérez-Ruiz et al., 2011; Chancey et al., 2015). Algunas aves pueden infectarse al consumir presas con VON en sus organismos, tales como insectos, pequeños mamíferos u otros pájaros (Pérez-Ruiz et al., 2011; CDC, 2013a). El virus también se puede transmitir entre mamíferos por transfusión de sangre, trasplante de órganos, por transmisión transplacentaria y a través de la leche materna (CDC, 2013b; Chancey et al., 2015). Si bien, la transmisión experimental del VON por picaduras de garrapatas se ha demostrado, el papel de estas en la transmisión natural y el mantenimiento del virus no se ha determinado (Lwande et al., 2014).

2.4. Epidemiología del VON

La mayoría de las infecciones en seres humanos con VON (80%) son asintomáticas y las infecciones sintomáticas pueden variar desde malestar gripal a enfermedades graves neuro invasivas, para el cual no existe un tratamiento específico. Alrededor del 20% de las infecciones da lugar a fiebre asociada con dolor de cabeza, erupciones, artralgias y mialgias. Menos del 1% de las infecciones progresan hasta enfermedad grave y muerte (Sotelo et al., 2009; Pérez-Ruiz et al., 2011; Ozkul et al., 2013; Chancey et al., 2015; Mentoer et al., 2016; Sayed-Ahmed, 2016).

La enfermedad grave en seres humanos está asociada a ciertos factores de riesgo, los más frecuentemente reportados incluyen la edad avanzada, supresión inmunitaria y enfermedades crónicas que incluyen, pero no se limitan a, hipertensión, diabetes e insuficiencia renal crónica (Lindsey et al., 2010). Los estudios sero-epidemiológicos en los Estados Unidos (EU), demuestran que del 20 al 25% de las personas infectadas con el VON desarrolla una enfermedad leve y el 0.67% de esos individuos desarrolla encefalitis asociada al virus (Chancey et al., 2015).

En los caballos, en el 20% de los casos de infecciones por VON manifiestan signos clínicos, de los cuales el 90% puede desarrollar enfermedad febril y neurológica, con una tasa de mortalidad que se acerca al 30-40%. Además, se ha descrito que los signos iniciales son gripe, fiebre leve, pérdida de apetito y estupor (Ozkul et al., 2013; Mentoer et al., 2016). Se reporta enfermedad por VON específicamente por los linajes 1 y 2. Otros signos son debilidad muscular en las extremidades traseras, temblor muscular, irritabilidad, inestabilidad postural y otros trastornos del movimiento (Ozkul et al., 2013; Chancey et al., 2015). El Departamento de Agricultura de los EU (USDA, por sus siglas en inglés), reportó del año 2000 hasta el 2017, un total de 28,096 casos en equinos de los 48 estados (USDA, 2018b).

Recientemente, se han reportado en algunos países, brotes simultáneos de casos clásicos de encefalitis en seres humanos y en caballos, asociados al linaje 1 del virus (CDC, 2013a; Ozkul et al., 2013; Mentoer et al., 2016). Por otra parte, los caballos parecen presentar mayor susceptibilidad al virus con un número de animales infectados que sobrepasa a las aves, mosquitos y seres humanos (Fernández-Salas et al 2007; Ciuderis-Aponte, 2009).

En las aves, el VON ha sido reportado mundialmente en 317 especies (Ciuderis-Aponte, 2009). Los géneros más susceptibles en Europa y Norte América son *Passeriformes* y *Corvidos* (Sotelo et al., 2009). En América latina, entre los géneros más susceptibles se han reportado a las *Paseriformes*, *Piciformes* y *Columbiformes* (Ciuderis-Aponte, 2009; Chaves et al., 2016), siendo estos mismos géneros en los que se ha detectado la infección

con VON en el sureste de México, específicamente en municipios al oriente de Yucatán (Chaves et al., 2016).

Los sistemas de vigilancia epidemiológica dependen de que la enfermedad se considere en los diagnósticos diferenciales de enfermedades virales y se utilicen las pruebas diagnósticas apropiadas, así como la notificación de los casos confirmados por laboratorio a las autoridades de salud pública. Debido al diagnóstico incompleto y a la baja notificación de los casos, la incidencia de la enfermedad del VON se subestima. De igual manera, los reportes de seroprevalencia son de gran importancia para el monitoreo de la distribución del virus en diferentes lapsos de tiempo y ubicaciones geográficas, lo que permite, posteriormente, definir estrategias de intervención en casos de epidemias (CDC, 2013a).

2.5. Métodos de diagnóstico de infecciones recientes por VON

El diagnóstico indirecto de la infección por VON se basa esencialmente en la demostración de anticuerpos IgG y/o IgM en el hospedero infectado. La demostración de anticuerpos IgM específica contra VON en suero sanguíneo se considera diagnóstica de una infección reciente. La toma de la muestra de suero debe realizarse entre los días 8 y 21 del inicio de los síntomas. Por ello pueden darse casos de falsos negativos cuando la sangre se extrae antes del día 8 o después del día 21. Se han descrito casos en los que los anticuerpos IgM específicos contra VON pueden persistir hasta 1 año; en estos casos, una determinación positiva aislada puede no ser indicativa de infección. De igual manera, para el diagnóstico de una infección reciente, se recomienda la toma de sueros pareados de fase aguda y fase convaleciente para demostrar seroconversión o aumento de 4 veces el título de anticuerpos IgG específicos (Pérez-Ruiz et al., 2011).

Las limitaciones para el serodiagnóstico del virus en zonas endémicas, se debe a que las pruebas serológicas pueden llegar a ser de poca utilidad diagnóstica contra la vigilancia del virus en las zonas donde se presentan otros *flavivirus* como el virus dengue (DENV). Por ello, ante una prueba serológica positiva (ELISA, IFI) es necesario confirmar el caso mediante otra técnica más específica como la neutralización del efecto citopático (Ciuoderis-Aponte, 2009; López, 2013; Pérez-Ruiz et al., 2011).

Para mejorar la especificidad de los ELISA contra VON, se han utilizado fragmentos de proteínas del virus para diferenciarlo entre los *flavivirus*. El fragmento dominio III (DIII) de la proteína E es un dominio de inmunoglobulina que sobresale de la superficie de la partícula viral. Los estudios sobre el DIII de la proteína E del virus de encefalitis japonesa (JEV), DENV y VON han mostrado diferencias en sus estructuras, particularmente en áreas que constituyen epítomos neutralizantes. Se ha demostrado que un ELISA con VON-DIII producido en bacterias pueden diferenciar claramente entre las respuestas de anticuerpos contra VON y las producidas por otros *flavivirus* relacionados, como virus de encefalitis San Luis (SLEV), JEV y virus de encefalitis de Murray-Valley (De Filette et al., 2012).

Los métodos considerados para la detección específica del virusson la prueba RT-PCR, basada en la amplificación de una secuencia específica de ácidos nucleicos (NASBA por sus siglas en inglés, *nucleic acid sequence-based amplification*) y el cultivo viral e identificándolo por inmunofluorescencia (IFA) con anticuerpos monoclonales (Berrocal et al., 2006; Pérez-Ruiz et al., 2011; Csank et al., 2016; García-Ruiz et al., 2016).

El diagnóstico de infecciones recientes por VON, por medio de la detección de ARN viral o anticuerpos IgM específicos contra el virus en suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo (LCR), se han empleado para la determinación de la circulación de cepas de VON en hospederos susceptibles en regiones geográficas que presenten las condiciones necesarias para su mantenimiento en vida silvestre (Pérez-Ruiz et al., 2011; García-Ruiz et al., 2016). La determinación de la circulación del VON permite anticiparse ante posibles brotes en seres humanos y animales domésticos como los equinos (CDC, 2013a).

En México, se han permitido las adaptaciones pertinentes a laboratorios utilizados en vigilancia epidemiológica del VON, siempre que se mantengan las restricciones de seguridad adecuadas según lo estipulado por CENAPRECE (2012) y lo acordado en la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014 para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores.

2.6. Distribución del VON en América del Norte

El reconocimiento del VON como patógeno emergente en el continente americano fue en 1999, causando en Nueva York una brote con 62 casos neurológicos y siete muertes en seres humanos, cuya circulación se manifestó inicialmente con una alta letalidad en aves silvestres (cuervos y gorriones americanos) y caballos (Kilpatrick, 2011; López, 2013). La cepa en este brote fue designada NY99 y el análisis genético de la secuencia de la proteína E, indicó que la cepa viral aislada estaba relacionada con un aislado de ganso en Israel en 1998, sugiriendo una amplia distribución geográfica a través del proceso de migración de las aves silvestres (Chancey et al., 2015); además, se han propuesto otras vías de propagación, incluyendo el movimiento accidental de mosquitos y/o aves en barcos comerciales o aviones (Kilpatrick, 2011).

La diseminación a Canadá inició en 2001 (Kilpatrick, 2011; López, 2013). La primera actividad del VON en el Caribe (Islas Caimán), fue el reporte de un caso de encefalitis en un ser humano al final del 2001. La mayor actividad del virus por el Caribe para los próximos años se limitó a observaciones de seropositividad en aves y caballos (Komar y Clark, 2006).

La infección con el VON es un problema de salud pública en los EUA, ya que el virus se ha convertido en endémico (Kilpatrick, 2011; Chancey et al., 2015). De 1999 a 2013, se presentaron 39,557 casos de VON en seres humanos, de los cuales 17,381 desarrollaron encefalitis asociada al virus, resultando en 1,667 muertes (CDC, 2013b). En todo el 2016, la CDC emitió un reporte de 406 casos de VON en seres humanos, de los cuales 190 presentaron enfermedad neuroinvasiva y 216 no neuroinvasiva, con un total de 9 muertes reportadas (CDC, 2016). Debido a que la mayoría de las infecciones con VON son asintomáticas o leves, muchas de ellas no son diagnosticadas, por lo que existe una subestimación importante de casos sintomáticos leves (Chancey et al., 2015).

Se ha evidenciado que en América del Norte, la incidencia de casos por VON aumenta con la urbanización y la agricultura, como resultado del uso y modificación de los hábitats naturales de los vectores principales, como *C. pipiens* y *C. tarsalis*. La distribución del

VON indica que su transmisión está relacionada con el uso antropogénico de la tierra y el aumento de la abundancia de animales domésticos y especies de vida silvestre que toleran a los seres humanos (Kilpatrick, 2011).

2.7. Distribución del VON en México

En México, los primeros reportes del VON se hicieron en el 2002 con casos de brotes de encefalitis en caballos a lo largo de la frontera de Texas con los estados de Coahuila, Tamaulipas y Chihuahua (Estrada-Franco et al., 2003). Asimismo, Blitvich et al. (2004), realizaron la detección de ARN de VON aislado del encéfalo de un caballo en Nuevo León, que falleció debido a encefalitis en 2003, denominada cepa MexNL-03 (acceso GenBank no. AY426741). Posteriormente, la secuenciación de nucleótidos y el análisis filogenético de los genes de la pre-membrana y la envoltura mostraron que esta cepa estaba estrechamente relacionada con los aislamientos del virus de Texas en el 2002.

Por otra parte, la primera secuencia del genoma de una cepa de VON aislado de un cuervo en Tabasco, denominada TM171-03 (acceso GenBank no. AY371271), mostró divergencia genética a la de otras cepas aisladas en el continente americano (Estrada-Franco et al., 2003). Las diferencias de virulencia en ratones infectados experimentalmente, entre las variantes purificadas en placa de TM171-03 con mutaciones de la glicosilación de la proteína E y proteínas no estructurales, demuestran la aparición de una mutación atenuada en virulencia (Beasley, 2005).

El primer caso humano de enfermedad por VON en México, fue confirmado por prueba de RT-PCR en 2004, posterior al aislamiento del virus en cultivos de células Vero (cepa Sonora, MX; acceso GenBank no. AY963774) por Elizondo-Quiroga et al. (2005), de igual manera, aislaron una cepa de VON de mosquitos (*C. quinquefasciatus*) en Nuevo León. La secuenciación parcial y el análisis de los 2 aislamientos indican que son genéticamente similares a otros aislados recientes del norte de México y del oeste de los EUA. De igual forma, en un estudio publicado por Fernández-Salas (2007), detectaron la presencia de virus en aves silvestres, equinos y seres humanos en el noreste de México, concluyendo que el virus se encontraba activo en el país.

En el 2009, se reportó un caso fatal en un hombre de 40 años que tuvo síntomas leves durante varias semanas y luego progresó a enfermedad neurológica, coma y muerte (Ríos-Ibarra et al., 2010).

Langevin et al. (2011) y Brault et al., (2011) demostraron mutaciones, tanto en los genes de pre-membrana (prM-I141T) y la envoltura (E-S156P) en una variante de VON (TM171-03-PP1) aislado en México, demostrando un fenotipo atenuado en dos especies de aves ampliamente distribuidas en América del Norte, los cuervos americanos y gorriones, lo cual explica la baja patogenicidad del virus, a comparación de las cepas circulantes en EUA y Canadá.

En el periodo de 2003 al 2012, se confirmaron, sólo ante la Secretaría de Salud (SSA), 11 casos de VON en todo México. Los estados afectados fueron Chihuahua, Oaxaca, Nuevo León y Sonora; el 63.3% de estos casos se concentraron en Chihuahua. No obstante, no fueron notificadas defunciones por la enfermedad viral. El grupo de edad mayormente afectado fue el de 25 a 44 años con el 45% de los casos y el resto de ellos en casi todos los grupos etarios. En el periodo de 2003 a 2006 mediante la vigilancia epizootiológica se identificó la circulación de VON en 22 estados del país; en 19 estados se aisló de equinos y en 9 de aves (SINAVE, 2012). Chaves et al. (2016), utilizaron la prueba de RT-PCR para estimar la frecuencia de VON en aves silvestres residentes en Tizimín, Yucatán, durante época de secas y lluvias, detectando el virus en 14 de ellas, representando 11 especies y tres órdenes. La prevalencia por orden fue *Passeriformes* (27%), *Columbiformes* (6%) y *Piciformes* (33%). Con esto confirmó, no solo la presencia del virus al oriente de Yucatán, si no que pueden evidenciar la circulación del virus durante todo el año.

Con respecto a investigaciones en equinos de Yucatán, en el 2003 se realizó el primer reporte de un estudio serológico en animales reactivos a anticuerpos IgG contra VON (Loroño-Pino et al., 2003). Adicionalmente, Farfán-Ale et al. (2006) reportaron anticuerpos contra el virus en 90 caballos de la isla de Cozumel, junto con otros animales (13 del zoológico de Mérida, incluyendo 7 aves y 2 mamíferos (un jaguar y un coyote) y 6

cocodrilos en Campeche); utilizando pruebas de detección de IgG por ELISA y confirmación de infección por prueba de Neutralización en reducción de placas (PRNT). De igual forma, Loroño-Pino et al. (2010) estimaron que el 15% de los caballos en el oriente de Yucatán presentan anticuerpos IgG contra el VON, principalmente en los municipios de Tizimín y Panabá. A pesar de estos estudios, no se ha detectado la presencia de caballos serológicamente positivos a anticuerpos IgM, lo que pueden ser un indicador de infección reciente del virus y circulación viral en los caballos, así como el posible riesgo de transmisión vectorial a otros hospederos susceptibles.

2.8. Importancia de los caballos domésticos en México

En México, los equinos como los caballos siguen siendo una ayuda indispensable al campesino marginado que vive en regiones remotas y mal comunicadas (SAGARPA, 2002). Los equinos de trabajo poseen importancia relevante para mucha gente, ya que son indispensables no sólo para las labores agrícolas, sino también para un número indeterminado de actividades dentro de las que se puede mencionar labores de carga, tracción y transporte, que se realizan en el medio rural como actividad secundaria. Además, los caballos tienen un papel fundamental en actividades relacionadas con la producción de alimentos, en donde la agricultura mexicana hace uso de la fuerza animal hasta en un 62% (Real, 1990; Levy y Rodríguez, 1993).

Por otro lado, los caballos promueven una industria que abarca desde la obtención de fármacos hasta la talabartería, puesto que se utilizan en una gran variedad de actividades de la vida diaria, llenan una serie de requisitos tanto en el aspecto material en forma de fuentes de trabajo, como en el emotivo sentimental. El incremento en el número de asociaciones charras, así como el incremento de clubes hípicas a nivel nacional además de otras actividades y espectáculos como son el polo, equitación, rejoneo, etc., mantienen en nuestro país una vasta fuente de actividades que incide de manera favorable sobre una gran cantidad de personas en México, y con ellos el interés de mejorar los sistemas de cría y explotación equinas (Real, 1990; Levy y Rodríguez, 1993).

Lo anterior, da relevancia pertinente para incluir a los caballos domésticos en estudios epidemiológicos, basados en la vigilancia de enfermedades de importancia zoonótica, como lo es el VON ya que son una especie que presenta gran susceptibilidad (CDC, 2013a).

2.9. Importancia de los caballos en el ciclo epidemiológico del VON

Las investigaciones en salud pública históricamente han utilizado animales silvestres o domésticos como centinelas para la vigilancia epidemiológica de distintas enfermedades zoonóticas virales, antes de que se produzca la transmisión a los seres humanos. Tal fue el caso del VON en 1999, ya que previo a los reportes de infecciones humanas en el primer brote de Nueva York en su introducción al continente americano, se describió con 2.5 meses de anticipación una alta tasa de mortalidad en cuervos y caballos domésticos (McNamara-Tracey, 2015).

En EUA se mantiene un sistema de vigilancia epidemiológica basado en el reporte de casos humanos y el monitoreo ambiental, en el que se relacionan factores climáticos y geográficos con las poblaciones de vectores y aves silvestres reservorios. El monitoreo de aves silvestres y domésticas se basa en el reporte de casos de morbilidad, mortalidad y estudios serológicos. Los datos generados pueden ser eficaces para determinar si el VON está activo en una región y en algunos casos, proporcionar un índice cuantitativo de riesgo para el contagio de seres humanos. Además, en este país se han utilizado otras especies de animales domésticos como centinelas en regiones geográficas determinadas, tales como los equinos y camélidos (llamas y alpacas) (CDC, 2013a).

Los caballos son susceptibles a la infección con el VON en los trópicos; por lo tanto, los casos de encefalitis equina inducida por este virus pueden utilizarse como centinelas en ausencia de otros programas de vigilancia ambiental. En países, donde hay pocas prácticas de inmunización en caballos, se puede predisponer a los équidos para su utilidad como centinelas (CDC, 2013a). En España, se han empleado équidos clínicamente sanos para evaluar la seroprevalencia del VON y establecer un seguimiento epidemiológico en las regiones donde no se vacuna a estos animales (García-Bocanegra et al., 2012). En los países latinoamericanos y en América del sur, los reportes de casos y estudios de

circulación del virus han implicado el diagnóstico en caballos domésticos (Burgeño et al., 2013; López, 2013). En México, la utilización de caballos como centinelas del VON queda evidenciada desde el primer reporte de circulación, el cual también involucró el diagnóstico en aves silvestres (Fernández-Salas et al., 2007).

2.10. Dinámica de infección de VON y respuesta inmune humoral en caballos

En caballos, el periodo de incubación de la enfermedad por VON después de la transmisión por picadura del vector biológico es de 3 a 15 días, tiempo en el que se produce una rápida viremia con baja titulación de anticuerpos que precede a la aparición de los signos clínicos (OIE, 2008). La detección de ARN por amplificación, como en las técnicas de RT-PCR, es usado en los periodos de viremia (Joó et al., 2017). La aparición de síntomas nerviosos se acompaña de la desaparición del virus en sangre y de la presencia de IgM contra el agente causal en suero (SENASA, 2010). En mamíferos, desde la aparición del ARN viral hasta la seroconversión de IgM e IgG son aproximadamente 4 y 8 días, respectivamente (Sambri et al., 2013).

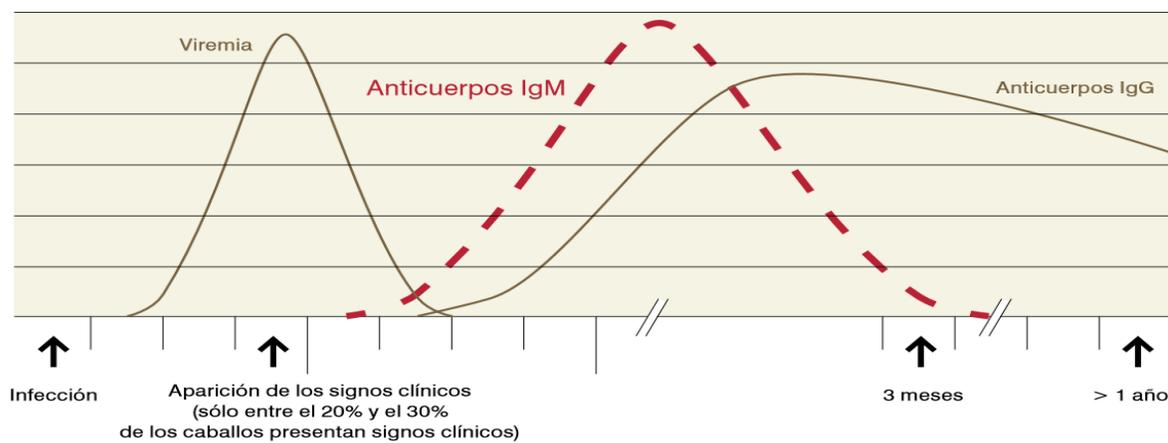


Figura 2. Esquematización de la dinámica de infección con VON y producción de anticuerpos en caballos (IDEXX Laboratories Inc., 2010).

En la mayoría de los casos, la IgM se puede detectar dentro de 4 a 10 días después de la exposición inicial al virus y pueden persistir por más de un año (figura 2) (De Filette et al.,

2012; Joó et al., 2017), pero frecuentemente es detectada por pruebas serológicas hasta 2 meses después de la infección inicial y, en la mayoría de los caballos con encefalitis, dan positivo a la prueba de ELISA de captura de IgM a la vez que se observan los primeros síntomas clínicos (OIE, 2009). Los anticuerpos IgG específicos para VON se detectan de forma fiable aproximadamente 8 días después del inicio de los síntomas, pero son de poca utilidad para el diagnóstico inicial de la infección con VON (De Filette et al., 2012; Joó et al., 2017). Los anticuerpos neutralizantes contra VON son detectables en suero equino dos semanas después de la infección y puede persistir durante más de un año (OIE, 2008; Pérez-Ruiz et al., 2011).

III. HIPÓTESIS

El virus del Oeste del Nilo circula en caballos de Tizimín y Panabá, Yucatán, México.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la circulación del virus del Oeste del Nilo en caballos de Tizimín y Panabá, Yucatán, México.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de inmunoglobulina M contra el virus del Oeste del Nilo mediante la prueba de ELISA de captura de IgM en caballos de Tizimín y Panabá, Yucatán, México.
2. Detectar ARN del virus del Oeste del Nilo por la prueba de RT-PCR, en los caballos positivos a IgM contra el virus del Oeste del Nilo, de Tizimín y Panabá, Yucatán, México.

V. REFERENCIAS

1. Beasley D. W. C. 2005. Recent Advances in the Molecular Biology of West Nile Virus. *Current Molecular Medicine*, Vol. 5: 835-850.
2. Berrocal L., Peña J., González M., Mattar S. 2006. Virus del Oeste del Nilo: Ecología y Epidemiología de un Patógeno Emergente en Colombia. *Revista de Salud Pública*. Vol. 8(2): 218-228.
3. Blitvich B.J., Fernández-Salas I., Contreras-Cordero J.F., Loroño-Pino M.A., Marlenee N. L., Díaz F. J., González-Rojas J. I., Obregón-Martínez N., Chiu-García J. A., Black IV W.C., Beaty B.J. 2004. Phylogenetic Analysis of West Nile Virus, Nuevo Leon State, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 10(7): 1314-1317.
4. Brault A. C., Langevin S. A., Ramey W. N., Fang Y., Beasley D. W. , Barker C.M., Sanders T.A., Reisen W.K., Barrett A.D., Bowen R.A. 2011. Reduced Avian Virulence and Viremia of West Nile Virus Isolates from Mexico and Texas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 85(4): 758–767.
5. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2013a. West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control, 4th Revision, June 14, 2013. Recuperado el 02 de septiembre de 2016, de: <http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/wnvguidelines.pdf>
6. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2013b. West Nile virus statistics and maps. Recuperado el 10 de septiembre del 2016, de: <http://www.cdc.gov/westnile/statsMaps/>.
7. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2016. West Nile Virus Neuroinvasive Disease Incidence by State – United States, 2016 (as of August 30, 2016). Recuperado el 02 de septiembre de 2016, de: <http://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/preliminarymapsdata/incidencestatedate.html>
8. CENAPRECE, Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. 2012. Guía para la Vigilancia, Prevención y Control de Virus del Oeste del Nilo. Recuperado el 10 de febrero de 2017, de:

http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/guia_vig_prev_ctrl_von.pdf

9. Chancey C., Grinev A., Volkova E., Rios M. 2015. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *BioMed Research International*. 2015(20).
10. Chaves A., Sotomayor-Bonilla J., Monge O., Ramírez A., Galindo F., Sarmiento-Silva R. E., Gutiérrez-Espeleta G.A., Suzán G. 2016. West Nile Virus in Resident Birds from Yucatan, Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*. 52(1):159-163.
11. Ciuderis-Aponte K.A. 2009. Virus del Oeste del Nilo: Enfermedad zoonótica emergente de posible importancia en Colombia. *Orinoquia*. Vol. 13(1): 46-58.
12. Colpitts T. M., Conway M. J., Montgomery R.R., Fikrig E. 2012. West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 25(4): 635–648.
13. Csank T., Bhide K., Bencurova E., Dolinska S., Drzewniokova P., Major P., Korytar L., Bockova E., Bhide M., Pistl J. 2016. Detection of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in birds in Slovakia, using a universal primer set. *Archives of Virology*. Vol. 161: 1679-83.
14. David, S., Abraham A. M. 2016. Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infectious Diseases*. Vol. 48: 571-586.
15. De Filette M., Ulbert S., Diamond M. S., Sanders N. N. 2012. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Veterinary Research*. Vol. 43(16): 02-15.
16. Dzul-Manzanilla Felipe, Manrique-Saide Pablo, Che-Mendoza Azael, Rebollar-Téllez Eduardo. 2010. Mosquitos de Yucatán. SEDUMA. Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán, Regionalización socio-productiva y biodiversidad. Recuperado el 15 de febrero de 2017 de: <http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap2/08%20Regionalizacion.pdf>
17. EPA, US Environmental Protection Agency. 2016. Climate Change Indicators: West Nile Virus. Recuperado el 12 de septiembre de 2016, de <https://www.epa.gov/climate-indicators/climate-change-indicators-west-nile-virus>

18. Elizondo-Quiroga D., Todd Davis C., Fernandez-Salas I., Escobar-Lopez R., Velasco Olmos D., Soto Gastalum L. C., Aviles Acosta M., Elizondo-Quiroga E., Gonzalez-Rojas J. I., Contreras Cordero, J. F., Guzman H., Travassos da Rosa A., Blitvich B. J., Barrett D.T., B. J. Beaty, Tesh R. B. 2005. West Nile Virus Isolation in Human and Mosquitoes, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 11 (9): 1449-52.
19. Estrada-Franco J.G., Navarro-Lopez R., Beasley D. W.C., Coffey L., Carrara A., Travassos da Rosa A., Clements T., Wang E., Ludwig G.V., Campomanes C.A., Paz R.P., Tesh R.B., Barrett A. D.T., Weaver S.C. 2003. West Nile Virus in Mexico: Evidence of Widespread Circulation since July 2002. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 9(12): 1604-07.
20. Farfán-Ale J.A., Blitvich B.J., Marlenee N. L., Loroño-Pino M. A., Puerto-Manzano F., García-Rejón J. E., Rosado-Paredes E. P., Flores-Flores L. F., Ortega-Salazar A., Chávez-Medina J., Cremieux-Grimaldi J. C., Correa-Morales F., Hernández-Gaona G., Méndez-Galván J. F., Beaty B. J. 2006. Antibodies to VON in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatán peninsula of México. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 74(5): 908–914.
21. Fernández-Salas I., Garza-Rodríguez M. de L., Beaty B.J., Ramos-Jiménez J., Rivas-Estilla A. M. 2007. Presencia del virus del oeste del Nilo en el noreste de México. *Salud Pública de México*, Vol. 49(3): 210-217.
22. Garcia-Bocanegra I., Arenas-Montes A., Jaen-Tellez J. A., Napp S., Fernandez-Morente M., Arenas A. 2012. Use of sentinel serosurveillance of mules and donkeys in the monitoring of West Nile virus infection. *Veterinary Journal*. Vol. 194: 262-264.
23. Garcia-Ruiz, D., Martinez-Guzman M. A., Cardenas-Vargas A., Marino-Marmolejo E., Gutierrez-Ortega A., Gonzalez-Diaz E., Morfin-Otero R., Rodriguez-Noriega E., Perez-Gomez H., Elizondo-Quiroga D. 2016. Detection of dengue, west Nile virus, rickettsiosis and leptospirosis by a new real-time PCR strategy. *Springerplus*. Vol. 5(1): 671. doi: 10.1186/s40064-016-2318-y.

24. IDEXX Laboratories Inc. 2010. Recuperado el 10 de junio del 2017 de: http://www.idexx.es/pdf/es_es/livestock-poultry/wnv-info-brochure-es.pdf
25. Joó K., Bakonyib T., Szenci O., Sárdi S., Ferenczie E., Barna M., Malikf P., Hubalekg Z., Fehéra O., Kutasia O. 2017. Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in equine serum after natural infection or vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 183: 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.015>
26. Kilpatrick A. M. 2011. Globalization, land use and the invasion of West Nile virus. *Science*. Vol. 334(6054): 323–327. doi:10.1126/science.1201010.
27. King M.Q. A., Adams J. M., Lefkowitz J. E., Carstens B. E. 2012. *Virus Taxonomy*. Nueva York, EUA. Editorial Elsevier.
28. Komar Nicholas y Clark Gary G. 2006. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Pública*. Vol. 19(2):112–117.
29. Langevin Stanley A., Bowen Richard A., Ramey Wanichaya N., Sanders Todd A., Maharaj Payal D., Fang Ying, Cornelius Jennine, Barker Christopher M., Reisen William K., Beasley David W. C., Barrett Alan D. T., Kinney Richard M., Huang Claire Y.-H., Brault Aaron C. 2011. Envelope and pre-membrane protein structural amino acid mutations mediate diminished avian growth and virulence of a Mexican West Nile virus isolate. *Journal of General Virology*. Vol. 92: 2810–2820.
30. Levy-Lazo De la Vega C. Y Rodríguez-Monterde A. 1993. *Temas Selectos de Zootecnia Equina*, Trillas, México.
31. Lindsey N. P., Staples J. Erin, Lehman J. A., Fischer M. 2010. Surveillance for human west Nile virus disease-United States, 1999–2008”. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Vol. 59(2): 1–17.
32. López P. 2013. Virus del Oeste del Nilo: un patógeno de importancia para Colombia. *Informe Quincenal Epidemiólogo Nacional*. Vol. 18 (19): 206-221.
33. Loroño-Pino María A., Blitvich Bradley J., Farfán-Ale José A., Puerto Fernando I., Blanco José M., Marlenee Nicole L., Rosado-Paredes Elsy P., García-Rejón Julián E., Gubler Duane J., Calisher Charles H., Beaty Barry J. 2003. Serologic evidence

- of West Nile Virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Revista Biomédica*, Vol. 14(3), 159-163.
34. Loroño-Pino M. A.; Farfan-Ale J. A.; Garcia-Rejon J. E.; Lin M.; Rosado-Paredes E.; Puerto F. I.; Bates A.; Root J. J.; Franklin A. B.; Sullivan H. J.; Blitvich B. J. 2010. Antibodies to Influenza and West Nile Viruses in Horses in Mexico. USDA National Wildlife Research Center-Staff Publications. Paper 940. http://digitalcommons.unl.edu/icwdm_usdanwrc/940
 35. Loza-Rubio E., Rojas-Anaya E., Lopez-Ramirez R. D., Saiz J. C. y Escribano-Romero E. 2016. Prevalence of neutralizing antibodies against West Nile virus (WNV) in monkeys (*Ateles geoffroyi* and *Alouatta pigra*) and crocodiles (*Crocodylus acutus* and *C-acutus-C-moreletti* hybrids) in Mexico. *Epidemiology and Infection*. Vol. 144: 2371-73.
 36. Lwande O.W., Venter M., Lutomiah J., Michuki G., Rumberia C., Gakuya F., Obanda V., Tigoi C., Odhiambo C., Nindo F., Symekher S., Sang R. 2014. Whole genome phylogenetic investigation of a West Nile virus strain isolated from a tick sampled from livestock in north eastern Kenya. *Parasites & Vectors*. Vol. 2014(7): 542.
 37. McNamara-Tracey S. (2015). Wildlife pathology studies and how they can inform public health. *ILAR Journal*. 56(3):306–311. doi: 10.1093/ilar/ilv043.
 38. Mentoor Juliet L.D., Lubisi Alison B., Gerdes Truuska, Human Stacey, Williams June H., Ventera M. 2016. Full-Genome Sequence of a Neuroinvasive West Nile Virus Lineage 2 Strain from a Fatal Horse Infection in South Africa. *Genome Announcements*. Vol. 4 (4): 740-716.
 39. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. Consultado el 12 de febrero de 2017, de: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/NO_M_032_SSA2_2014.pdf
 40. OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres, Fiebre del Nilo

- Occidental. París, Francia. Recuperado el 15 de marzo de 2017 de: www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/2008/pdf/2.01.20_WEST_NILE.pdf
41. Ozkul Aykut, Ergunay K., Koysuren A., Alkan F., Arsava E. M., Tezcan S., Emekdas G., Hacıoglu S., Turan M., Us D. 2013. Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: the first evidence for circulation of lineage 1 viruses. *International Journal of Infectious Diseases*. Vol. 2013(17): 546–551.
 42. Pérez-Ruiz M., Sanbonmatsu G. S. y Claverob J. M. A. 2011. Infección por virus West Nile, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Vol. 29(5): 21-26.
 43. Real Venegas, C.O. *Zootecnia Equina*, Trillas, México, 1990.
 44. SAGARPA (2002) Comité consultivo nacional para el informe sobre la situación de los recursos genéticos pecuarios de México. Recuperado el día 17 de noviembre de 2016, de: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1250e/annexes/CountryReports/Mexico.pdf>
 45. Sambri V., Capobianchi M. R., Cavrini F., Charrel R., Donoso-Mantke O., Escadafal C., Franco L., Gaibani P., Gould E. A., Niedrig M., Papa A., Pierro A., Rossini G., Sanchini A., Tenorio A., Varani S., Vázquez A., Vocale C., Zeller H. 2013. Diagnosis of West Nile Virus Human Infections: Overview and Proposal of Diagnostic Protocols Considering the Results of External Quality Assessment Studies. *Viruses*. Vol. 2013(5): 2329-48; doi:10.3390/v5102329
 46. Sayed-Ahmed M. 2016. Incidence history of West Nile Virus in Africa and Middle East, with an emphasis on Egypt: A Review. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*. Vol. 3(3): 00080.
 47. SINAVE, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2012. Aviso epidemiológico Virus del Oeste del Nilo. Revisado el 04 de septiembre del 2016 de: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/avis_o_virus_nilo210812.pdf
 48. Soler-Tovar D. y Vera V. 2011. Evaluación del Virus del Oeste del Nilo en aves silvestres de una isla del Caribe colombiano. *Ornitología Colombiana* (11): 14-20.

49. Sotelo E., Fernandez-Pinero J., Llorente F., Agüero M., Hoefle U., Blanco J. M., Jiménez-Clavero M.A. 2009. Characterization of West Nile virus isolates from Spain: New insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. *Virology*. Vol. 2009(395): 289–297.
50. Sule W. F., Oluwayelu D. O., Adedokun R. A., Rufai N., McCracken F., Mansfield K. L., Johnson N. 2014. High Seroprevalence of West Nile Virus Antibodies Observed in Horses from Southwestern Nigeria. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Vol. 15(3): 1706.
51. USDA, States Department of Agriculture. 2018. Develop a Surveillance Plan: Case Definitions & Classification. Case definition for West Nile Virus. Revisado el 02 de febrero de 2018 de: <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/ceah-toolbox/case-definitions>
52. USDA, States Department of Agriculture. 2018b. 2017 Summary of West Nile Virus Equine Cases in the United States. Revisado el 02 de febrero de 2018 de: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/downloads/animal_diseases/2017-wnv-report.pdf

1 **VI. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN.**

2 Realizado con el formato de envío a la revista “*Tropical Animal Health and Production*”.

3

4 **CIRCULACIÓN DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN CABALLOS DE**
5 **TIZIMÍN Y PANABÁ, YUCATÁN, MÉXICO**

6 **CIRCULATION OF WEST NILE VIRUS IN HORSES FROM TIZIMÍN AND**
7 **PANABÁ, YUCATÁN, MEXICO**

8 J. E. Ortiz-Esquivel^{1*}, J. A. Rosado-Aguilar¹, R. I. Rodríguez-Vivas^{1*}, M. A. Torres-
9 Castro², E. J. Gutiérrez-Ruiz¹, F. I. Puerto-Manzano².

10

11 ¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán,
12 Mérida, Yucatán, México.

13 ²Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de
14 Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

15 *Autor de correspondencia: rvivas@correo.uady.mx (Rodríguez-Vivas R.I.)

16 ORCID: 0000-0001-8785-1219 (Ortiz-Esquivel J.E.), 0000-0002-4941-9123 (Rosado-
17 Aguilar J.A.), 0000-0002-3340-8059 (Rodríguez-Vivas R.I.), 0000-0002-8295-0100
18 (Torres-Castro M.A.), 0000-0001-6754-9338 (Gutiérrez-Ruiz E.J.) 0000-0001-9726-2039
19 (Puerto-Manzano F.I.).

20 **AGRADECIMIENTOS**

21 Al CONACYT por la beca otorgada al MVZ. José Emigdio Ortiz Esquivel, para la
22 realización de sus estudios de Maestría en Ciencias Agropecuarias en el Campus de
23 Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán, así como al
24 personal del Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes del Centro de
25 Investigaciones Regionales “Hideyo Noguchi” por su apoyo en la realización de este
26 estudio.

27

28 **RESUMEN**

29 El Virus del Oeste del Nilo (VON) es un *flavivirus* ampliamente distribuido a nivel
30 mundial. Las aves silvestres son hospederos amplificadores del virus y los mosquitos del
31 género *Culex* son los vectores. Los seres humanos y los caballos son hospederos finales y
32 accidentales. En Yucatán, México se han reportado en caballos bajas prevalencias de
33 anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) específicos para VON y la presencia del virus en
34 aves silvestres. El objetivo de este trabajo fue determinar la circulación del VON en
35 caballos de Tizimín y Panabá, Yucatán, México. Por conveniencia se estudiaron 184
36 caballos de 23 unidades de producción en dos municipios de Yucatán. De cada caballo se
37 obtuvo sangre de la vena yugular. Los sueros obtenidos fueron analizados por una prueba
38 de ELISA de captura para detectar IgM específicos contra VON. Las muestras
39 seropositivas fueron analizadas por una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa por
40 Retrotranscripción (RT-PCR) para detectar ARN viral. De los 184 caballos estudiados, 8
41 fueron seropositivos (IgM) contra VON y dos sospechosos, teniendo una frecuencia del
42 4.3% de seropositivos. Todas las muestras seropositivas a inmunoglobulina M (IgM)
43 resultaron negativas a la prueba de prueba de RT-PCR, lo que indica infecciones recientes
44 con VON y no presentes durante el muestreo. Se concluye que la detección de IgM contra
45 VON en caballos demuestra infecciones recientes con el virus e indica su circulación en
46 Tizimín y Panabá, Yucatán, México.

47

48 **Palabras clave:** Caballos, Virus del Oeste del Nilo, frecuencia, ELISA, IgM.

49

50

51

52

53

54 **ABSTRACT**

55

56 The West Nile Virus (WNV) is a *flavivirus* widely distributed worldwide. Wild birds are
57 hosts that amplify the virus and mosquitoes of the genus *Culex* are the vectors. Humans and
58 horses are final and accidental hosts. In Yucatan, Mexico, prevalence of immunoglobulin G
59 (IgG) antibodies specific to VON and the presence of the virus in wild birds have been
60 reported in horses. The objective of this work was to determine the circulation of VON in
61 horses from Tizimín and Panabá, Yucatán, México. For convenience, 184 horses of 23
62 production units were studied in two municipalities of Yucatan. Blood from the jugular
63 vein was obtained from each horse. The sera obtained were analyzed by a capture ELISA
64 test to detect immunoglobulin M (IgM) against VON. The seropositive samples were
65 analyzed by a Retrotranscription Polymerase Chain Reaction test (RT-PCR) to detect VON.
66 Of the 184 horses studied, 8 were seropositive (IgM) to VON and two suspects, with a
67 frequency of 4.3% of seropositive. IgM seropositive samples were negative for the RT-PCR
68 test, indicating recent infections with VON and not present during sampling. It is concluded
69 that the detection of IgM against VON in horses shows recent infections with the virus and
70 indicates their circulation in Tizimín and Panabá, Yucatán, México.

71

72 **Key words:** Horses, WNV, frequency, ELISA, IgM.

73

74

75

76

77

78 1. INTRODUCCIÓN

79 El Virus del Oeste del Nilo (VON) es un *flavivirus* ampliamente distribuido a nivel mundial
80 (Chancey et al., 2015; Mentoor et al., 2016; Sayed-Ahmed, 2016). Los mosquitos del
81 género *Culex* son los vectores y las aves silvestres actúan como hospederos amplificadores
82 del virus. Los seres humanos y los equinos son hospederos finales y accidentales, en los
83 cuales las manifestaciones clínicas van desde enfermedad asintomática hasta la encefalitis
84 (David y Abraham 2016; Loza-Rubio et al., 2016).

85 El diagnóstico de infecciones recientes con VON por medio de la detección de ARN viral o
86 IgM específicas contra el virus en suero sanguíneo, se han empleado para la determinación
87 de la circulación del VON en especies susceptibles (Pérez-Ruiz et al., 2011; García-Ruiz et
88 al., 2016), lo que permite anticiparse ante posibles brotes (CDC, 2013). Los caballos se
89 infectan con VON en los trópicos (CDC, 2013) y pueden actuar como centinelas en el
90 monitoreo de la transmisión del virus a los seres humanos, en ausencia de programas de
91 vigilancia ambiental (García-Bocanegra et al., 2012; CDC, 2013).

92 En México, los primeros reportes del VON se hicieron en el año 2002 en caballos con
93 encefalitis en Coahuila, Tamaulipas y Chihuahua (Estrada-Franco et al., 2003). En México
94 se ha reportado un número bajo de casos de enfermedad en seres humanos, caballos y aves
95 silvestres (cuervos y gorriones americanos), principalmente en la frontera norte con los
96 Estados Unidos (EU) (Chancey et al., 2015). En 2003, se reportan por primera vez en
97 Yucatán caballos reactores positivos a IgG contra VON (Loroño-Pino et al., 2003). Loroño-
98 Pino et al. (2010) estimaron que el 15% de los caballos en el oriente de Yucatán presentan
99 anticuerpos IgG contra al VON. Recientemente, Chaves et al. (2016) utilizaron la prueba de
100 Reacción en Cadena de la Polimerasa por Retrotranscripción (RT-PCR) y estimaron la
101 frecuencia de VON del 6 a 27% de las aves estudiadas. A pesar de estos estudios, no se han
102 detectado caballos serológicamente positivos a anticuerpos IgM, lo que puede ser un
103 indicador de infección reciente del virus en los caballos y el posible riesgo de transmisión
104 vectorial a otros hospederos. El objetivo de este trabajo fue determinar la circulación del
105 VON en caballos de Tizimín y Panabá, Yucatán, México.

106 2. MATERIALES Y MÉTODOS

107 2.1. Lugar de estudio

108 El estudio se realizó en unidades de producción animal de los municipios de Tizimín y
109 Panabá, Yucatán, México. Los dos municipios presentan actividades agropecuarias que
110 cubren la mitad de su superficie (49%), con predominio de pastizales cultivados
111 introducidos y ganadería semi-extensiva (SEDUMA, 2010). El clima predominante es
112 cálido subhúmedo con lluvias en verano (A w) con una temperatura media anual de 26°C y
113 precipitación pluvial de 1,228 mm (INEGI, 2016).

114

115 2.2. Tipo de estudio y animales estudiados

116 Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo de tipo transversal en caballos,
117 aplicando un muestreo no aleatorio. Se eligieron por conveniencia 184 caballos de 23
118 unidades de producción (de 7-10 caballos por unidad). Se muestrearon sin distinción de
119 sexo, raza y función zootécnica. Se tomaron como criterio de inclusión a aquellos caballos
120 mayores de 1 año, con condición corporal de 4 a 7 en una escala del 1 al 9, según la escala
121 de condición corporal Henneke (1983) y sin antecedentes de haber sido inmunizados contra
122 el VON. Además, se obtuvo un historial clínico por cada caballo, por parte de los
123 propietarios y del médico veterinario responsable.

124 2.3. Toma de muestras.

125 De cada animal se obtuvieron 5 ml de sangre completa mediante punción de la vena
126 yugular, con aguja 21G x 38 mm (0.8 mm x 38 mm) y fueron depositados en un tubo
127 Vacutainer® sin anticoagulante para centrífuga. Las muestras fueron identificadas con el
128 nombre del caballo; además, se registraron la edad, sexo, marcas particulares, lugar de
129 procedencia y coordenadas geográficas de los caballos, así como los datos del propietario.
130 Estas muestras se trasladaron al Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes
131 del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”-UADY, en una nevera en
132 condiciones de refrigeración (4° C). Las muestras se centrifugaron a 1500 x g durante 5
133 minutos para separar el suero, que se depositó en dos viales de criopreservación de 1.5 ml,

134 previamente identificados y se congelaron a -70°C , hasta el momento de la realización de
135 las pruebas diagnósticas.

136 **2.5. Detección de anticuerpos inmunoglobulina M (IgM) específicos contra VON** 137 **mediante la prueba de ELISA de captura (MAC)**

138 Los sueros de equinos (previamente diluidos a una concentración de 1:400) fueron
139 analizados con la prueba comercial de ELISA de captura IDEXX IgM WNV Capture
140 ELISA Test (IDEXX, Westbrook, ME, Estados Unidos) que contiene dos microplacas con
141 96 pocillos cada una, de acuerdo a lo descrito por la casa comercial. Brevemente, por cada
142 microplaca se utilizaron cuatro pozos por cada placa para los controles positivo y negativo,
143 en los 92 restantes se dispensaron por duplicado 46 muestras de suero de caballos, con
144 antígeno de células normales (no específico contra VON) en la mitad superior de la
145 microplaca y con antígeno recombinante de VON en la mitad inferior, esto se realizó en
146 ambas microplacas. En las muestras que resultan reactivas, la IgM equina contra VON
147 queda fijada al revestimiento de IgM anti-equinas en los pocillos de la microplaca. Ambas
148 microplacas fueron observadas a 450nm de longitud de onda. La intensidad del color es
149 proporcional a la cantidad de anticuerpos presente en la muestra problema. Esta prueba ha
150 reportado una sensibilidad del 91.7% y una especificidad del 99.2% (Long et al., 2006).

151 Para la determinación de los sueros reactivos o sospechosos se calculó el índice de
152 respuesta inmune (ISR) que es el coeficiente de interpretación entre densidades ópticas. Se
153 consideró como negativo <2.0 , sospechoso $2.0-3.0$ y positivo >3.0 . Todas las muestras
154 positivas y sospechosas a IgM contra VON en la prueba de MAC-ELISA fueron analizadas
155 por RT-PCR.

156 **2.6. Detección del fragmento de genoma de VON por prueba de Reacción en Cadena** 157 **de la Polimerasa por Retrotranscripción (RT-PCR) en punto final**

158 Todas las muestras reactivas a IgM contra VON por MAC-ELISA, fueron analizadas por
159 RT-PCR.

160 La extracción de ARN viral en los sueros se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en
161 el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen Inc®, Valencia CA., Estados

162 Unidos). La reacción de la transcriptasa reversa (RT) se llevó a cabo siguiendo el protocolo
163 del estuche comercial RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo
164 scientific®), utilizando 5 µl de la extracción de ARN. Las condiciones en el termociclador
165 fueron: alineamiento durante dos minutos a 42° C, amplificación durante 50 minutos a
166 42°C y un ciclo adicional de 15 minutos a 70° C para inactivar la enzima Taq Polimerasa
167 (Promega®).

168 Para la detección de genoma de VON se realizó una PCR punto final, en ella se emplearon
169 los cebadores descritos por Lanciotti et al. (2001): sentido 5'-
170 TTGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTT-3' y anti-sentido 5'-
171 CAGCCGACAGCACTGGACATTCATA-3', los cuales amplifican un fragmento
172 conservado de 408 pb ubicado entre los genes de la proteína de la nucleocápside (C) y de la
173 pre-membrana (prM) del VON.

174 Los reactivos de la reacción tuvieron las siguientes concentraciones finales en un volumen
175 final de 25 µl: 1X buffer, 0.2 mM de dNTP's, 2.5 mM de MgCl², 0.4 µM de cada cebador,
176 1U de Taq polimerasa, 3 µl de muestra del cDNA y H²O ultrapura cbp. El programa del
177 termociclador fue: desnaturalización inicial durante cinco minutos a 95°C, seguido de 40
178 ciclos (desnaturalización durante un minuto a 95° C, alineamiento durante un minuto a 60°
179 C, amplificación durante dos minutos a 72° C) y una elongación final de cinco minutos a
180 72° C.

181 En todas las reacciones se emplearon como control positivo ARN inactivado (vacuna) de
182 VON y agua estéril como control negativo. La electroforesis de los productos de PCR se
183 realizó en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio al 5%. Posteriormente,
184 se utilizó un foto-documentador (Bio-Rad®) para observar los posibles productos positivos.

185

186 3. RESULTADOS

187 Se muestrearon un total de 184 caballos, de los cuales 123 pertenecieron a Tizimín y 63 a
188 Panabá. Ocho (4.3%, 8/184) de los caballos estudiados fueron seroreactivos y dos

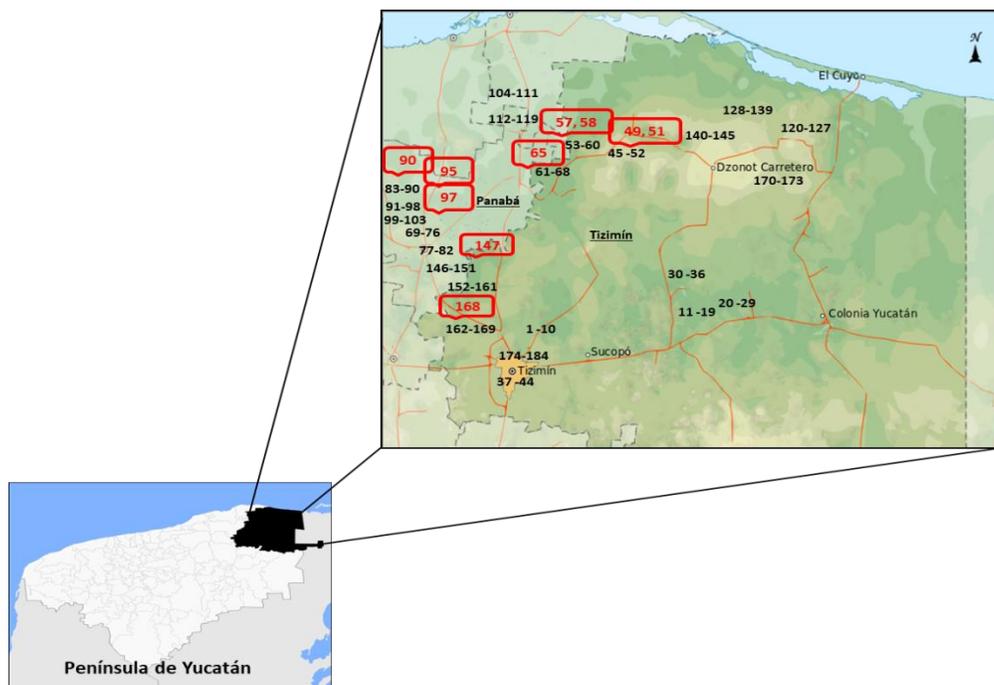
189 sospechosos (1.1%) (Cuadro 1). Todas estas muestras resultaron negativas a la prueba de
 190 RT-PCR (figura 2).

191 En la inspección física de los caballos estudiados y con base en el historial clínico, ninguno
 192 manifestó sintomatología clínica asociada a la infección con VON, antes o durante el
 193 muestreo.

194 **Cuadro 1.** Resultados de las muestras positivas y sospechosas a IgM (MAC-ELISA) contra
 195 el VON en caballos los municipios de Tizimín y Panabá, Yucatán.

| ID | Coordenadas de la unidad de producción | Resultado MAC- ELISA | | |
|-----|--|----------------------|---|---------------------------|
| | | ISR de ELISA | Grados de absorbancia a DO 450 nm** | Estatus de diagnóstico |
| 49 | N: 21° 23.394' W: 088° 05.202' | 7.30 | WNRA: 0.562 NCA: 0.077 | Positivo |
| 51 | N: 21° 23.394' W: 088° 05.202' | 3.32 | WNRA: 0.176 NCA: 0.053 | Positivo |
| 57 | N: 21° 22.469' W: 088° 07.820' | 2.48 | WNRA: 0.149 NCA: 0.06 | Sospechoso |
| 58 | N: 21° 22.469' W: 088° 07.820' | 5.67 | WNRA: 0.374 NCA: 0.066 | Positivo |
| 65 | N: 21° 23.395' W: 088° 05.202' | 6.24 | WNRA: 0.424 NCA: 0.068 | Positivo |
| 90 | N: 21° 25.036' W: 088° 25.751' | 4.07 | WNRA: 0.281 NCA: 0.069 | Positivo |
| 95 | N: 21° 19.053' W: 088° 35.288' | 12.83 | WNRA: 0.68 NCA: 0.053 | Positivo |
| 97 | N: 21° 19.053' W: 088° 35.288' | 2.38 | WNRA: 0.283 NCA: 0.119 | Sospechoso |
| 147 | N: 21° 31.317' W: 087° 59.351' | 8.58 | WNRA: 1.055 NCA: 0.123 | Positivo |
| 168 | N: 21.257922 W: 088.254890 | 4.39 | WNRA: 0.259 NCA: 0.059 | Positivo |

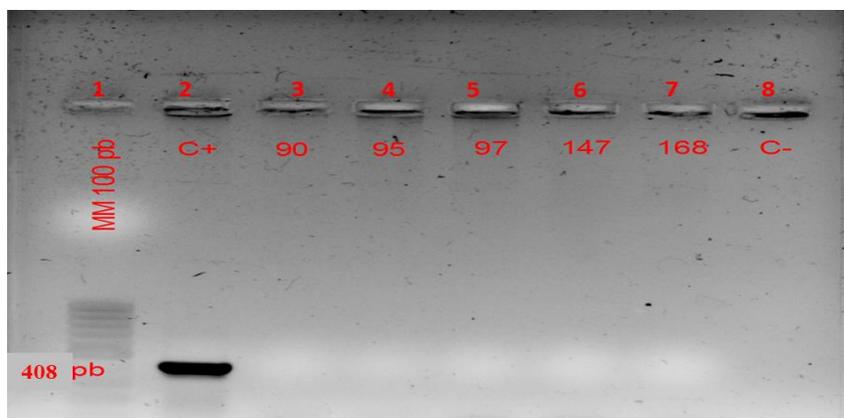
196 ID: Identificación, ISR: índice de respuesta inmune, *densidades ópticas leídas a 450 nm
197 para reactivos con WNRA (antígeno recombinante de VON) y con NCA (antígeno celular
198 normal).



199

200 **Figura 1.** Esquematzación de la localidad de Tizimín, Yucatán, México, en la que se
201 realizaron los muestreos para el presente estudio. Los números en negro, representan los
202 caballos muestreados y los números en rojo representan los positivos a IgM contra VON.

203



204

205 **Figura 2.** Resultados de las reacciones de RT-PCR, visualizadas en gel de agarosa teñido
206 con bromuro de etidio, posterior a la electroforesis. Carril 1, marcador de peso molecular
207 100 pb; carril 2, control positivo (virus inactivo); carril 3-7 muestras negativas; carril 8,
208 control negativo.

209

210 **4. DISCUSIÓN**

211 Los 8 caballos de Tizimín y Panabá seropositivos a IgM contra VON, indican una
212 frecuencia del 4.3%. Sin embargo, 2 sueros resultaron sospechosos a presencia de IgM
213 (1.1%), lo cual es debido a que los títulos de IgM en sangre podrían no ser lo
214 suficientemente altos para pasar el punto de corte de la prueba serológica y ser
215 considerados como positivos, como sucede en infecciones sub-agudas de baja titulación, en
216 un periodo de tiempo menor a los 4 a 10 días en los que puede detectarse la IgM después de
217 la exposición viral inicial (De Filette et al., 2012; Joó et al., 2017). De igual manera, una
218 infección con más de 2 meses de evolución podría generar una baja titulación de IgM
219 posterior al tiempo en que una prueba es capaz de detectarla, ya que se ha reportado que la
220 IgM puede ser identificada posterior a los 2 meses después de la infección inicial y en
221 escasas situaciones pueden persistir hasta por más de un año (OIE, 2009; Joó et al., 2017).
222 De acuerdo a De Filette et al. (2012), se ha determinado que los títulos de IgM en caballos
223 post infección natural pueden ser iguales, incluso después de inoculaciones virales
224 posteriores a la inoculación inicial.

225 Tanto los caballos positivos como los sospechosos fueron negativos a la prueba de RT-
226 PCR, lo cual indica que no presentaron una viremia detectable o activa en el momento del
227 muestreo. Según la OIE (2008), el periodo de viremia en caballos es rápido y esta se
228 produce en el periodo de incubación de la enfermedad después de la transmisión del VON
229 por la picadura del vector, la cual es de 3 a 15 días; durante este tiempo, la titulación de
230 anticuerpos es baja, debido a que se inicia su producción y precede a la aparición de signos
231 clínicos, en caso de que estos se presenten.

232 La especificidad de las pruebas de ELISA, como la empleada en este estudio, se han
233 mejorado actualmente, con la implementación de fragmentos de proteínas específicos de
234 VON para diferenciarlo entre diferentes *flavivirus*, siendo el más utilizado el DIII de la
235 proteína E de inmunoglobulina que sobresale de la superficie de la partícula viral (De
236 Filette et al., 2012); el antígeno recombinante usado en el estuche comercial expresa gran
237 cantidad de estos epítopes de interés. Además, el anti-IgM equina fijado al fondo de las
238 placas de ELISA, es un anticuerpo monoclonal selectivo para su unión al epítopo del DIII
239 de la proteína E de la IgM equina.

240 La prueba MAC-ELISA, ha presentado un buen comportamiento en cuanto a su exactitud
241 para detectar IgM contra VON en caballos en regiones endémicas para el virus, según lo
242 publicado por Long et al. (2006) en EUA., Barbić et al. (2013) en Croacia y Joó et al.
243 (2017) en Hungría e Italia. La prueba de MAC-ELISA empleada en este estudio fue
244 validada para el diagnóstico de IgM contra VON en un estudio con caballos en Florida, EU,
245 por Long et al. (2006), quienes determinaron que su especificidad y la sensibilidad fue del
246 91.7 y 99.2%, respectivamente. Por lo tanto, se determinó que puede ser empleada de
247 manera confiable para la identificación de caballos con exposición reciente al VON. Por
248 otra parte, la prueba MAC-ELISA de “tipo” comercial utilizada en este estudio (IDEXX
249 IgM WNV Capture ELISA Test) fue probada en un estudio por Joó et al. (2017), quienes
250 demostraron una sensibilidad y especificidad del 95% (tomando la prueba de neutralización
251 como prueba de oro de referencia) en una región endémica de VON (Hungría), donde
252 además circulan de otros *flavivirus*. Barbić et al. (2013), demostraron la utilidad de una
253 prueba “tipo” comercial para la determinación de la circulación del VON en caballos de
254 Croacia por medio de la detección de IgM contra el virus, pudiendo diferenciarlo de otras
255 infecciones por *flavivirus* circulantes en la región y de manera anticipada a la aparición de
256 brotes en seres humanos.

257 Los municipios de Tizimín y Panabá, fueron elegidos como sitios de estudio con base en
258 los estudios serológicos reportados en Yucatán para la presencia de anticuerpos IgG contra
259 VON en caballos. Loroño-Pino et al. (2003), informaron por primera vez una frecuencia del
260 1.12% (3/252) de caballos con anticuerpos IgG contra VON (obtenida por prueba de

261 neutralización) en la zona costera, centro y oriente de Yucatán, siendo más de la mitad de
262 los casos positivos (2/3) de Tizimín. De igual manera, Loroño-Pino et al. (2010),
263 encontraron una frecuencia de anticuerpos IgG de 15% (28/186), obtenida por prueba de
264 ELISA de bloqueo en municipios del oriente de Yucatán, incluyendo Panabá y Tizimín.
265 Loroño-Pino et al. (2010), han explicado que la diferencia en las frecuencias de caballos
266 seropositivos a IgG, reportadas en diferentes años, podría deberse a una mayor densidad de
267 caballos en municipios del oriente del estado comparado con otras regiones de Yucatán, así
268 como aumentos en la introducción del virus por medio de la migración de aves silvestres al
269 sureste de México. Basado en los resultados de dichos estudios, únicamente se ha podido
270 demostrar la exposición de esos caballos a la infección por VON en un solo lapso, lo cual
271 no es un indicativo de circulación viral actual. Además, Según Joó et al. (2017), han
272 confirmado que los caballos pueden llegar a presentar títulos suficientemente altos de IgG
273 de hasta 1 y 3 años post infección.

274 Pérez-Ruiz et al. (2011), mencionan que para la determinación de la circulación del VON u
275 otros *flavivirus* en una región, es necesario el diagnóstico de casos nuevos de infección por
276 la detección del agente viral o por la detección de infecciones recientes por medio de la
277 demostración de IgM en suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo. En países como
278 España, se han utilizado estas estrategias de diagnóstico para detectar de forma temprana la
279 circulación del VON en una región y anticiparse ante posibles brotes en especies
280 susceptibles. En este contexto, García-Bocanegra et al. (2012), lograron demostrar que el
281 uso de equinos como mulas y burros, funciona para el monitoreo de la introducción y
282 distribución del VON en España, por medio de la demostración de infecciones recientes, al
283 detectar 4 veces los títulos de IgG contra VON en pruebas de neutralización con otros
284 *flavivirus*.

285 Los municipios de Panabá y Tizimín, presentan un clima cálido subhúmedo con lluvias en
286 verano (Aw), con una temperatura media anual de 26°C y precipitación pluvial anual de
287 1,228 mm (SEDUMA, 2010; INEGI, 2016); lo cual, según lo reportado por la EPA (2016),
288 son condiciones de regiones tropicales idóneas para el mantenimiento de los vectores
289 biológicos del VON y es en la temporada de lluvias cuando se da un aumento de la

290 densidad de la población de estos vectores en zonas selváticas y peri domésticas.
291 Asimismo, otro factor que pudiera influir en el mantenimiento de la circulación del VON
292 en la región de estudio, son las condiciones apropiadas (condiciones climáticas necesarias
293 para la supervivencia de las especies involucradas, densidad poblacional adecuada de
294 mosquitos, óptimo número de hospederos susceptibles, etc.) para que ocurra una estabilidad
295 enzoótica en la población de aves silvestres, que son las principales responsables del
296 mantenimiento del ciclo de transmisión primario (Colpitts et al., 2012; Chancey et al.,
297 2015).

298

299 La infección en los caballos y posiblemente en otras especies susceptibles como los seres
300 humanos, es viable cuando se produce un desbordamiento del ciclo enzoótico en zonas
301 selváticas de regiones tropicales. La infección de los caballos puede ser favorecida por
302 múltiples factores, incluyendo cambios en la proximidad a los mosquitos y con las especies
303 de aves reservorios (EPA, 2016; USDA, 2018). En Yucatán, México se ha descrito una
304 amplia distribución de las especies de mosquitos que fungen como vectores biológicos para
305 arbovirus como el VON, principalmente especies del género *Culex* (Dzul-Manzanilla et al.,
306 2010), los cuales que pueden estar presentes en los sitios de estudio tanto en zonas
307 selváticas y peri domésticas, con la capacidad de infectar a los caballos con el virus.

308

309 Chaves et al. (2016), evidenciaron la circulación del VON en aves silvestres residentes de
310 Tizimín, por medio de la detección del agente viral en época de lluvias y secas, lo cual
311 sirvió para demostrar la circulación del VON en estos reservorios durante todo el año;
312 además, la frecuencia de aves que reportaron fue mayor en los sitios no conservados de
313 suelo que se han destinado para la ganadería y el cultivo de pastizales, los cuales se han
314 determinado como los factores asociados a la frecuencia (14%) encontrada en aves
315 silvestres de esta región. Los géneros de aves silvestres residentes que se han reportado
316 como positivos, coinciden con los más frecuentemente reportados en América Latina
317 (*Paseriformes*, *Piciformes* y *Columbiformes*) y en los que se encuentran especies que se
318 distribuyen desde la zona costera hasta la zona ganadera (Ciuoderis-Aponte, 2009; Chaves
319 et al., 2016).

320

321 Según Kilpatrick (2011), es de esperarse que en algunas regiones de América del Norte, la
322 incidencia del VON en especies susceptibles aumente como resultado de la creciente
323 urbanización y de la destrucción de los hábitats naturales utilizados para la agricultura y
324 ganadería (incluyendo regiones tropicales), ya que se ha demostrado que la distribución del
325 VON está relacionada con el uso antropogénico de la tierra y el aumento de la abundancia
326 de animales domésticos y especies de aves silvestres que toleran a los seres humanos. Lo
327 anterior puede ser un factor que influye en la infección de los caballos en la región de
328 estudio, ya que Tizimín y Panabá cuentan casi con un 49% de su superficie destinada para
329 la ganadería y agricultura, con aumento gradual de presencia antropogénica (SEDUMA,
330 2010; INEGI, 2016). Chaves et al. (2016), también mencionan que las aves migratorias en
331 la Península de Yucatán siguen desempeñando un papel importante en la transmisión del
332 VON, porque pueden provenir directamente de sitios a lo largo de la costa este de los EUA
333 donde se detectó el VON por primera vez y donde aún sigue propagándose.

334

335 No se pudieron atribuir signos clínicos relacionados con la enfermedad por VON en los
336 caballos seropositivos a IgM, antes o durante los dos meses de muestreo, basado en el
337 historial clínico obtenido de los propietarios, lo que podría indicar la presencia de
338 infecciones asintomáticas. De acuerdo a la OIE (2008), la mayoría de los casos de infección
339 en caballos son asintomáticos a nivel mundial y no exclusivamente en los trópicos. Se ha
340 dado diversas explicaciones a la presencia de infecciones asintomáticas en personas y
341 animales susceptibles en los países de regiones tropicales (incluyendo México) a diferencia
342 de otros países de Norte América, siendo unas de las más aceptadas las reacciones cruzadas
343 con *flavivirus* que circulan en la mismas regiones donde está presente el VON y la
344 evidencia de circulación de cepas de VON genotípicamente atenuadas en virulencia en
345 México (Brault et al., 2011; Kilpatrick, 2011; Langevin et al., 2011).

346 Los resultados de este estudio no explican el comportamiento epidemiológico del VON en
347 Yucatán, para lo cual es necesario realizar estudios posteriores, como el aislamiento y
348 caracterización genética de las cepas de VON que circulan, a fin de proporcionar

349 información sobre posibles factores genéticos que pueden diferenciar entre cepas altamente
350 virulentas y las atenuadas en virulencia.

351 Se concluye que la detección de IgM contra VON en caballos demuestra infecciones
352 recientes con el virus e indica su circulación en Tizimín y Panabá, Yucatán, México.

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369 **5. REFERENCIAS**

- 370 Barbić L., Stevanović V., Kovač S., Maltar L., Lohman Janković I., Vilibić-Čavlek T.,
371 Madić J. 2013. West Nile virus serosurveillance in horses in Croatia during the
372 2012 transmission season. *Medical Sciences*. 39: 95-104.
- 373 Brault A., Langevin A., Ramey N., Fang Y., Beasley C., Barker M., Sanders A., Reisen,
374 K., Barrett D., Bowen A. 2011. Reduced Avian Virulence and Viremia of West
375 Nile Virus Isolates from Mexico and Texas. *American Journal of Tropical*
376 *Medicine and Hygiene*. 85 (4): 758–767.
- 377 CDC, 2013. West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance,
378 Prevention, and Control, 4th Revision, June 14, 2013. Centers for Disease
379 Control and Prevention. Consultado el 02 de septiembre de 2016 de:
380 <http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/wnvguidelines.pdf>
- 381 Chancey C., Grinev A., Volkova E., Rios M. 2015. The Global Ecology and
382 Epidemiology of West Nile Virus. *BioMed Research International*. 2015 (20).
- 383 Chaves A., Sotomayor-Bonilla J., Monge O., Ramírez A., Galindo F., Sarmiento-Silva
384 E., Gutiérrez-Espeleta A., Suzán G. 2016. West Nile Virus in resident birds from
385 Yucatan, Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*. 52 (1): 000–005.
- 386 Ciuderis-Aponte K.A. 2009. Virus del oeste del Nilo: Enfermedad zoonótica
387 emergente de posible importancia en Colombia. *Orinoquia*. 13 (1): 46-58.
- 388 Colpitts T. M., Conway M. J., Montgomery R. R. Fikrig E. 2012. West Nile Virus:
389 Biology, transmission, and human infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 25
390 (4): 635–648.
- 391 David S., Abraham A. M. 2016. Epidemiological and clinical aspects on West Nile
392 virus, a globally emerging pathogen. *Infectious Diseases*. 48(8): 571-586.
- 393 De Filette M., Ulbert S., Diamond S., Sanders N. 2012. Recent progress in West Nile
394 virus diagnosis and vaccination. *Veterinary Research*. 43 (16): 02-15.

395 EPA, US Environmental Protection Agency. 2016. Climate Change Indicators: West
396 Nile Virus. Recuperado el 12 de septiembre de 2016, de
397 [https://www.epa.gov/climate-indicators/climate-change-indicators-west-nile-](https://www.epa.gov/climate-indicators/climate-change-indicators-west-nile-virus)
398 [virus](https://www.epa.gov/climate-indicators/climate-change-indicators-west-nile-virus)

399 Estrada-Franco J. G., Navarro-Lopez R., Beasley D. W.C., Coffey L., Carrara A.,
400 Travassos da Rosa A., Clements T., Wang E., Ludwig G. V., Campomanes C.
401 A., Paz R. P., Tesh R. B., Barrett A. D.T., Weaver S. C. 2003. West Nile Virus
402 in Mexico: Evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerging*
403 *Infectious Diseases*, Vol. 9 (12): 1604-07.

404 Garcia-Bocanegra I., Arenas-Montes A., Jaen-Tellez A., Napp S., Fernandez-Morente
405 M., Arenas A. 2012. Use of sentinel serosurveillance of mules and donkeys in
406 the monitoring of West Nile virus infection. *Veterinary Journal*. 194: 262-264.

407 Garcia-Ruiz D., Martinez-Guzman M.A., Cardenas-Vargas A., Marino-Marmolejo E.,
408 Gutierrez-Ortega A., Gonzalez-Diaz E., Morfin-Otero R., Rodriguez-Noriega E.,
409 Perez-Gomez H., Elizondo-Quiroga D. 2016. Detection of dengue, west Nile
410 virus, rickettsiosis and leptospirosis by a new real-time PCR strategy.
411 *Springerplus*. 5 (9).

412 Henneke D., Potter G.D., Kreider J.L., Yeates B.F. 1983. Relationship between
413 condition score, physical measurements and body fat percentages in mares.
414 *Equine Vet J*. 15: 371-372.

415 IDEXX Laboratories Inc. 2010. [http://www.idexx.es/pdf/es_es/livestock-poultry/wnv-](http://www.idexx.es/pdf/es_es/livestock-poultry/wnv-info-brochure-es.pdf)
416 [info-brochure-es.pdf](http://www.idexx.es/pdf/es_es/livestock-poultry/wnv-info-brochure-es.pdf). Consultado el 10 de junio del 2017.

417 INEGI (2016). Anuario estadístico y geográfico de Yucatán. Instituto Nacional de
418 Estadística, Geografía e Informática.
419 http://www.datatur.sectur.gob.mx/ITxEF_Docs/YUC_ANUARIO_PDF16.pdf.
420 Consultado el 05 de febrero de 2017.

- 421 Joó K., Bakonyib T., Szenci O., Sárdi S., Ferenczie E., Barna M., Malikf P., Hubalekg
422 Z., Fehéra O., Kutasi O. 2017. Comparison of assays for the detection of West
423 Nile virus antibodies in equine serum after natural infection or vaccination.
424 *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 183: 1-6.
425 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.015>
- 426 Kilpatrick A. 2011. Globalization, land use and the invasion of West Nile virus.
427 *Science*. 334(6054): 323–327. doi:10.1126/science.1201010.
- 428 Lanciotti R.S., Kerst A.J., Nasci S., Godsey S., Mitchell J., Savage M., Komar N.,
429 Panella A., Allen C., Volpe E., Davis S., Roehrig T. 2001. Rapid detection of
430 West Nile Virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and
431 avian samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay. *Journal of*
432 *Clinical Microbiology*. 38 (11): 4066–4407.
- 433 Langevin A., Bowen A., Ramey N., Sanders T.A., Maharaj D., Fang Y., Cornelius J.,
434 Barker M., Reisen K., Beasley D., Barrett A., Kinney M., Huang C., Brault A.
435 2011. Envelope and pre-membrane protein structural amino acid mutations
436 mediate diminished avian growth and virulence of a Mexican West Nile virus
437 isolate. *Journal of General Virology*. 92: 2810–2820.
- 438 Long M.T., Jeter W., Hernandez J., Sellon D.C., Gosche D., Gillis K., Bille E., Gibbs
439 E.P. 2006. Diagnostic performance of the equine IgM capture ELISA for
440 serodiagnosis of West Nile Virus infection. *Journal of Veterinary Internal*
441 *Medicine*. 20: 608–613.
- 442 Loroño-Pino M., Blitvich B., Farfán-Ale J., Puerto F., Blanco J., Marlenee N., Rosado-
443 Paredes E., García-Rejón J., Gubler J., Calisher C., Beaty B. 2003. Serologic
444 evidence of West Nile Virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Revista*
445 *Biomédica*. 14 (3): 159-163.
- 446 Loroño-Pino M. A.; Farfan-Ale J. A.; Garcia-Rejon J. E.; Lin M.; Rosado-Paredes E.;
447 Puerto F. I.; Bates A.; Root J. J.; Franklin A. B.; Sullivan H. J.; Blitvich B. J.

448 2010. Antibodies to Influenza and West Nile Viruses in Horses in Mexico.
449 USDA National Wildlife Research Center-Staff Publications. Paper 940.
450 http://digitalcommons.unl.edu/icwdm_usdanwrc/940

451 Loza-Rubio E., Rojas-Anaya E., Lopez-Ramirez R., Saiz J., Escribano-Romero E.
452 2016. Prevalence of neutralizing antibodies against West Nile virus (WNV) in
453 monkeys (*Ateles geoffroyi* and *Alouatta pigra*) and crocodiles (*Crocodylus*
454 *acutus* and *C-acutus-C-moreletti* hybrids) in Mexico. *Epidemiology and*
455 *Infection*. 144: 2371-2373.

456 Mentoor L.D.J., Lubisi B.A., Truuska G., Human S., Williams H. J., Ventera M. 2016.
457 Full-Genome Sequence of a Neuroinvasive West Nile Virus Lineage 2 Strain
458 from a Fatal Horse Infection in South Africa. *Genome Announcements*. 4 (4):
459 740-716.

460 OIE, 2008. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales
461 terrestres, Fiebre del Nilo Occidental. Organización Mundial de Sanidad
462 Animal, París, Francia. Consultado el 15 de marzo de 2017 de:
463 www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/2008/pdf/2.01.20_WEST_NILE.pdf.

464 Ozkul A., Ergunay K., Koysuren A., Alkan F., Arsava M., Tezcan S., Emekdas G.,
465 Hacioglu S., Turan M., Us D. 2013. Concurrent occurrence of human and equine
466 West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: the first evidence for
467 circulation of lineage 1 viruses. *International Journal of Infectious Diseases*.
468 2013 (17): 546–551.

469 Pérez-Ruiz M., Sanbonmatsu G.S., Claverob J.M.A. 2011. Infección por virus West
470 Nile, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29 (5): 21-26.

471 Sayed-Ahmed M. 2016. Incidence History of West Nile Virus in Africa and Middle
472 East, With an Emphasis on Egypt: A Review. *Journal of Dairy, Veterinary &*
473 *Animal Research*. 3 (3): 00080.

474 SEDUMA. 2010. Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán, Regionalización
475 socio-productiva y biodiversidad. Consultado el 15 de febrero de 2017 de:
476 [http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap2/08%20](http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap2/08%20Regionalizacion.pdf)
477 [Regionalizacion.pdf](http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap2/08%20Regionalizacion.pdf)

478 Sotelo E., Fernandez-Pinero J., Llorente F., Agüero M., Hoefle U., Blanco J. M.,
479 Jiménez-Clavero M.A. 2009. Characterization of West Nile virus isolates from
480 Spain: New insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the
481 Western Mediterranean. *Virology*. 2009 (395): 289–297.

482 USDA. States Department of Agriculture. 2018. Develop a Surveillance Plan: Case
483 Definitions & Classification. Case definition for West Nile Virus. Revisado el
484 02 de febrero de 2018 de:
485 [https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/ceah-toolbox/case-](https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/ceah-toolbox/case-definitions)
486 [definitions](https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/ceah-toolbox/case-definitions)