

Presencia del virus del oeste del Nilo en el noreste de México

Ildefonso Fernández-Salas, Dr;⁽¹⁾ María de Lourdes Garza-Rodríguez, MC,⁽²⁾ Barry J Beaty, Dr;⁽³⁾
Javier Ramos Jiménez, Dr;⁽⁴⁾ Ana María Rivas-Estilla, Dra.⁽²⁾

Fernández-Salas I, Garza-Rodríguez ML,
Beaty BJ, Ramos-Jiménez J, Rivas-Estilla AM.
Presencia del virus del oeste del Nilo
en el noreste de México
Salud Pública Mex 2007;49:00-00.

Resumen

Objetivo. Detectar la presencia del virus del oeste del Nilo (VON) en aves, equinos y seres humanos en el noreste de México. **Material y métodos.** Se buscó en diferentes localidades del noreste de México la presencia de anticuerpos antivírus del oeste del Nilo (anti-VON) en suero de 33 aves, 24 caballos y 237 personas mediante pruebas de ELISA durante el periodo de julio del 2003 a julio del 2006. En los sueros humanos se buscó también el RNA-VON mediante RT-PCR. **Resultados.** Se encontraron tres aves seropositivas y 15 equinos. En el hombre, 40% de los sueros fue positivo para anticuerpos IgG y ninguno para anticuerpos IgM. **Conclusiones.** El VON se encuentra activo en México y se suma a otras enfermedades emergentes transmitidas por vectores que representan un reto a la investigación y los programas de prevención.

Palabras clave: virus del oeste del Nilo; noreste de México; Ac IgG-VON; Ac IgM-VON; flavivirus; México

Fernández-Salas I, Garza-Rodríguez ML,
Beaty BJ, Ramos-Jiménez J, Rivas-Estilla AM.
Presence of west Nile virus
in northeast Mexico
Salud Pública Mex 2007;49:00-00.

Abstract

Objective. To investigate the presence of WNV in birds, horses and humans in northeast Mexico. **Material and Methods.** Serum samples from 33 birds, 24 horses and 237 humans were screened by ELISA for Anti-WNV antibodies. Human serum samples were also screened for WNV RNA using an RT-PCR assay. **Results.** Positive sera were found in three birds and 15 horses. Forty percent of the human serum samples were positive for IgG antibodies and 0% for IgM antibodies and viral RNA. **Conclusions.** The results of this study show that WNV is present in northeast Mexico and it is a new emergent infectious agent that represents a challenge for research and prevention programs in Mexico.

Key words: west nile virus, northeast Mexico, flavivirus, IgG-WNV antibodies, IgM-WNV antibodies; Mexico

(1) Laboratorio de Entomología Médica, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

(2) Laboratorio de Infectología Molecular, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UANL.

(3) Laboratory of Arthropod Infectious Diseases, Microbiology Department, Colorado State University.

(4) Departamento de Infectología, Hospital Universitario "José Eleuterio González", UANL.

Fecha de recibido: 18 de septiembre de 2006 • Fecha de aceptado: 21 de marzo de 2007

Solicitud de sobretiros: Dr. Ildefonso Fernández-Salas. Laboratorio de Entomología Médica, Facultad de Ciencias Biológicas UANL.

AP 109-F Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria. 66451 Nuevo León, México.

Correo electrónico: ifernand@ccr.dsi.uanl.mx

El virus del oeste del Nilo (VON) se identificó por primera vez en 1937 en una mujer febril en Uganda, al oeste del río Nilo.¹⁻⁵ Los primeros casos naturales de encefalitis en seres humanos por VON se informaron en 1957 en Israel y desde entonces se han notificado epidemias en África, Europa y Medio Oriente. En 1999 se comunicó un brote de encefalitis en personas en Nueva York, que coincidió con brotes en cuervos y aves exóticas con una elevada tasa de mortalidad.^{2,6} La llegada del VON al continente americano marcó la introducción de un virus al Nuevo Mundo, la primera en la historia reciente.

En los siguientes seis años el virus ha presentado brotes anuales y se ha esparcido a lo largo de Estados Unidos (EU) y Canadá, así como el Caribe y Latinoamérica.⁷ Tan sólo en EU se han informado más de 100 especies diferentes de aves infectadas y 43 especies de mosquitos.⁸ Respecto de las infecciones en seres humanos, hasta diciembre de 2006 se habían notificado en EU 23,886 casos de infecciones por VON, 934 fatales. El número de casos de infección con VON se ha incrementado con el tiempo, lo que indica que la transmisión del VON sigue en evolución y que el virus se ha establecido como un virus endémico y epidémico en esta nueva área geográfica.⁹

El virus del oeste del Nilo es un miembro de la familia Flaviviridae (género *Flavivirus*), a la que también pertenecen otros virus transmitidos por vectores, como el virus del dengue (VD), el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis de San Luis, entre otros.^{6,10,11} Es un virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de 11 Kb, que codifica tres proteínas estructurales (cápside, membrana y envoltura) y siete proteínas no estructurales.¹² Su ciclo natural incluye la participación de aves silvestres y domésticas, migratorias y residentes, las cuales tienen el papel de reservorios y amplifican de manera eficiente las poblaciones virales. Los mosquitos ornitofílicos (en particular del género *Culex*) se alimentan de estas aves durante su tiempo de sueño.⁸ Los seres humanos y otros mamíferos se consideran huéspedes incidentales y no son capaces de amplificar el virus (viremias bajas). La mayoría de los pacientes infectados (80%) no presenta síntomas, 20% desarrolla una fiebre muy similar a otras fiebres por virus, como el VD y el virus de la influenza. Menos de 1% de los pacientes desarrolla síntomas neurológicos variables, desde una rigidez de nuca y desorientación hasta una parálisis flácida aguda, meningoencefalitis y muerte.^{6,8} Para el diagnóstico del VON se emplean pruebas serológicas y moleculares. El diagnóstico serológico en personas incluye la detección de anticuerpos (Ac) IgG e IgM por medio de ELISA de captura, en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR); la detección de anti-

cuerpos del tipo IgM en LCR y hallazgos clínicos que concuerdan con una infección por VON confirman el diagnóstico.^{8,13,14} Uno de los principales problemas de las pruebas serológicas en seres humanos es su elevada reactividad cruzada con otros flavivirus, como el VD, lo que complica el diagnóstico en zonas endémicas para otros flavivirus.¹⁵ Una prueba muy útil es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta prueba molecular permite identificar el VON a partir de suero, LCR o cultivos en células vero.^{16,17} Las aves desempeñan una función muy importante en el mantenimiento del virus, ya que actúan como reservorios, amplifican y dispersan el virus a través de sus ciclos anuales de migración.¹⁸ Se han identificado más de 43 especies de mosquitos como vectores probados del VON,⁸ entre ellos las especies *Culex pipiens* y *quinquefasciatus*.¹⁹ Estas dos especies son también muy abundantes en el noreste de México y sus sitios de oviposición son los cuerpos de agua con gran cantidad de materia orgánica.

Además de las aves también se han referido caballos infectados con el VON.²⁰ Cabe señalar que los equinos parecen presentar mayor sensibilidad al virus, dado que según los informes del Centro para Prevención y Control de Enfermedades (Atlanta), en el estado de Texas la distribución de equinos infectados sobrepasa de manera muy evidente la de aves, mosquitos y seres humanos.

Los primeros informes de actividad del VON en México se publicaron en julio del 2003, cuando se detectaron anticuerpos contra el VON en caballos en los estados de Coahuila y Yucatán.^{21,22} Comunicaciones más recientes incluyen la identificación de caballos, aves y mosquitos infectados, así como el informe de un caso confirmado en una persona en el estado de Sonora.²²⁻²⁵

En México, sobre todo en los estados del noreste (Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila) se activó un estado de alarma epidemiológica en los sistemas de salud por los informes de casos humanos, equinos infectados, aves silvestres y especies de mosquitos vectores positivos al VON notificados en los estados de Texas y Louisiana de EU, ya que constituyen un alto riesgo de potenciales epidemias de VON en esta región. Este hecho resaltó la gran importancia de detectar de modo oportuno la presencia de este agente viral. La Secretaría de Salud de México inició la vigilancia seroepidemiológica del VON desde el año 2003. Hasta la fecha ya se han registrado casos positivos en aves y equinos. En el caso de personas, la Secretaría de Salud ha muestreado sueros de 24 estados de la República y todas las muestras resultaron negativas.²⁶

En el noreste de México se ha establecido un grupo de trabajo formado por investigadores y profesionales de diversas instituciones y centros de investigación con

el objetivo de reconocer el VON en esa región. Para ello se trazaron los siguientes objetivos: a) buscar anticuerpos neutralizantes contra el VON en aves vivas y equinos con síntomas sospechosos; b) identificar anticuerpos neutralizantes contra el VON en equinos con síntomas sospechosos; y c) reconocer la presencia del virus en seres humanos.

Material y métodos

Área de estudio

Los municipios que colindan con el estado de Texas se establecieron como estaciones de muestreo debido a su cercanía con la región donde se registró la actividad del VON. Además, se consideró que estos municipios estaban cercanos al área metropolitana en donde podían representar riesgo potencial para dicha área urbana. Estos municipios tienen condiciones ecológicas favorables para la presencia de aves, mosquitos, caballos y cuerpos de agua para la reproducción de los mosquitos. Las características fisiográficas del norte de los tres estados corresponden a climas semidesérticos, con vegetación espinosa baja y matorral medio perennifolio presente sobre una topografía de lomeríos suaves y medianos. La temperatura promedio anual es de 28° C y una humedad relativa de 60-70%. La precipitación media anual es menor de 500 mm, distribuida en una estación corta de lluvias entre abril y mayo con lluvias sobre todo en el trimestre de septiembre a noviembre. Las muestras de animales analizadas para la búsqueda del VON recolectadas en los diferentes lugares de estudio corresponden a un corte en el periodo comprendido entre julio del 2003 y julio del 2006.

Muestreo de aves y equinos

Se recolectaron aves migratorias y residentes del área de estudio, en los mismos municipios, cada dos semanas. Alrededor de 30 redes de niebla de 6 m cada una, que recomendó la Asociación Americana de Ornitológia, se colocaron en sitios estratégicos. A cada ave se le extrajeron 0.05 y 0.1 ml de sangre, se identificó su especie y después se liberaron.²⁷ En las áreas donde había poblaciones de cuervos se utilizó un rifle de red para atraparlos. Cada muestra de sangre se colectó con jeringas de insulina y luego se almacenaron con solución de PBS y albúmina bovina al 1%. Estas muestras se enviaron al laboratorio de virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, donde se analizaron con posterioridad los sueros por una prueba de ELISA de bloqueo para anticuerpos contra el VON. Las muestras que resultaron

seropositivas al VON se confirmaron en el Laboratory of Arthropod Infectious Diseases, Microbiology Department, Colorado State University, mediante la prueba de neutralización de la reducción de placas (PNRP). Las muestras de equinos enfermos o muertos con síntomas de VON se recolectaron con apoyo de la Sagarpa y personal de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CMEUPFAEEA). Los caballos sospechosos, es decir, aquellos que mostraron síntomas de enfermedad neurálgica, se sometieron a extracción de 10 ml de sangre de la vena yugular. Tal y como se realizó con las aves vivas, el suero de estas muestras se analizó con la prueba de ELISA de bloqueo para identificar anticuerpos contra el VON y confirmadas por PNRP.

Muestreo en seres humanos

El Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la UANL evaluó y aprobó el presente estudio en personas. Los pacientes recibieron información oral y escrita del estudio y firmaron una carta de consentimiento informado. De enero de 2005 a junio de 2006 se recolectaron datos epidemiológicos y muestras de suero y LCR de sujetos atendidos por la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León y el Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la UANL. Estas instituciones se escogieron por la capacidad de atender y cubrir a una proporción considerable de población en el noreste de México. Las edades de los pacientes incluidos fueron de 1 a 73 años, con un promedio de 29 años de edad y una media de 25 años. Hasta 30% de los sujetos correspondía a hombres y 70% a mujeres. Los pacientes estudiados se clasificaron en tres grupos, según fueran los datos clínicos consistentes con una infección por VON (fiebre y datos clínicos de neuroinfección). En el grupo A se incluyó a las personas con enfermedad neuroinvasiva no bacteriana (aséptica); en el grupo B a pacientes con síntomas indicativos de fiebre por VON o VD; y en el grupo C a individuos con diagnóstico serológico de infección con el VD. Este último grupo se incluyó para analizar la reactividad cruzada de anticuerpos de los tipos IgG e IgM de ambos virus. Las sujetos del grupo A provenían de diferentes municipios del estado de Nuevo León y sólo uno de ellos procedía del estado de Tamaulipas; los pacientes de los grupos B y C eran residentes del estado de Nuevo León.

Prueba de ELISA de bloqueo

Esta prueba siguió el protocolo de Hall y colaboradores²⁸ con algunas modificaciones. Los pozos de una

microplaca se cubrieron con 100 μ l de antígeno diluido en amortiguador de bicarbonato de sodio (50 mM de bicarbonato de sodio, pH de 9.6) y se utilizó como antígeno control el sobrenadante de un cultivo celular no infectado. Estas placas se incubaron toda la noche a 4° C y después se lavaron con 250 μ l de amortiguador de lavado (PBST). Se agregaron a cada pozo 200 μ l de amortiguador bloqueador (PBS con 5.0% de leche en polvo descremada) y se incubó por 40 minutos a 37° C. Después se añadieron 50 μ l de suero de ave o caballo diluido (1:10) a cada pozo y se incubaron por dos horas a 37° C. Con posterioridad los pozos se lavaron seis veces más con 250 μ l de amortiguador de lavado. Se incubaron los pozos con anticuerpo monoclonal contra la proteína NS1 (3.1112G), diluido en amortiguador bloqueador (1:2 000) y se agregaron a cada pozo (50 μ l). Después se incubaron los pozos por una hora a 37° C. Las placas se lavaron y se añadieron 50 μ l de peroxidasa de rábano conjugada con IgG antirratón preparada en conejo, a una dilución 1:2 000 en cada pozo y otra vez se incubó por una hora a 37° C. Los pozos se lavaron de nueva cuenta seis veces con amortiguador de lavado. Se mezclaron volúmenes iguales de ABTS [(ácido 2,2' azino-bis [etilbenzitiazolino-6-sulfónico]) y soluciones de peroxidasa del sistema de sustrato peroxidasa y de esta solución se tomaron 75 μ l que se añadieron a cada pozo (KPL, Gaithersburg, MD). La densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 415 nm se determinó mediante un lector automático de placas. El porcentaje de inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal se calculó con la siguiente fórmula:

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

donde TS = media de densidad óptica de sueros problemas,

CS = media de densidad óptica de suero control (de aves no infectadas), y

B = densidad óptica del fondo.

Los sueros problemas se analizaron por duplicado o triplicado. El porcentaje de inhibición se determinó cuando la media de densidad óptica en los pozos que contenían suero control era mayor de 0.3. Un valor de inhibición $\geq 30\%$ se consideró indicador de la presencia de anticuerpos virales.

Pruebas de ELISA de captura en seres humanos

Para realizar las pruebas de ELISA se utilizaron estuches de la compañía Focus, los cuales emplean el antígeno recombinante aprobado por la FDA para el diagnóstico

de infecciones por VON en personas. Además de los controles y calibradores de los estuches, se usaron sueros controles positivos y negativos que proporcionaron los CDC. La detección de anticuerpos IgG se realizó en placas de poliestireno recubiertas con el antígeno recombinante. Los anticuerpos IgM se detectaron en placas de poliestireno recubiertas con anticuerpos anti-IgM humana, la cual reaccionó con las muestras de los pacientes y después se agregó el antígeno recombinante. Cada muestra se analizó por duplicado según las especificaciones del proveedor.^{29,30}

Pruebas de RT-PCR en seres humanos

Para la detección del genoma viral del VON se realizaron pruebas de RT-PCR. El RNA de las muestra de suero y LCR se extrajo mediante el método TRIZOL LS (Invitrogen) y con base en las recomendaciones del proveedor. La síntesis del DNAc del VON se realizó a 42° C con la enzima Superscript II según las indicaciones del proveedor (Invitrogen). Los oligonucleótidos usados amplifican una región que incluye regiones de la proteína C y la proteína pre-M.³¹ Se estandarizaron las condiciones para reconocer el genoma del VON por RT-PCR anidada a partir de suero y LCR (cuadro I). Se utilizaron controles negativos de agua miliQ estéril y como control positivo se usó un plásmido pCR 4 topo (Invitrogen) que contiene un fragmento del genoma de VON que corresponde a los genes de la proteínas C y pre-M del VON. Los productos amplificados corresponden a un tamaño de 408 y 193 pb y se analizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

Prueba de neutralización de la reducción de placas (PNRP)

La capacidad de muestras de suero de las aves para neutralizar VON se determinó mediante PNRP. Las muestras de suero se inactivaron por calor a 56° C por 30 minutos y después se hicieron diluciones seriadas en diluyente BA1 (sales de Hank M-199, 50 mM Tris, pH de 7.6, albúmina de suero de bovino al 1%, bicarbonato de sodio 0.35 g/l, 100 unidades de penicilina/ml, 100 mg/ml de estreptomicina, 1 mg/ml fungizona). En seguida se mezclaron 100 μ l de suero diluido con un volumen igual de diluyente que contenía 200 unidades de virus formadores de placas. Se transfirieron 100 μ l de suspensión de suero viral hacia monocapas de células Vero en microplacas de seis pozos incubadas a 37° C por 60 minutos. A cada pozo se añadieron 3 ml de solución salina equilibrada de Earl, deficiente al rojo neutro, que contenía 20 g/l de extracto de levadura, 100 g/l de hidrolizado de lactalbumina, 25% de FBS, 1% de fungi-

Cuadro I

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA PCR PARA AMPLIFICAR LAS PROTEÍNAS C Y PRE-M DEL VON (DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UANL)

Iniciadores

VON 1	TTG TGT TGG CTCTCT TGG CGT TCT T
VON 2	CAGCCGACAGCACTGGACATTCTATA
VONn 3	CGATGCTGGATCGATGGAGAGG
VONn 4	CCGCCGATTGATAGCACTGGT

*Condiciones de amplificación (RT-PCR)**Concentración final*

Amortiguador 10 X	IX
dNTP 10 mM	0.4 mM
Oligo VON1 y VON2	0.6 _M
RT-DNA Taq	I _I
RNA	20 _I

Ciclos

I ciclo	50°C/30 min
I ciclo	95°C/15 min
35 ciclos	94°C/45 seg, 56°C/45 seg y 72°C/I min
I ciclo	72°C/10 min

PCR anidado

Amortiguador 10 X	IX
dNTP 10 mM	0.2 mM
Oligos VON3 y VON4	0.3 _M
Taq polimerasa	0.625 U
Templado	I _I

Ciclos de amplificación

I	94°C/3 min
22	94°C/45 seg, 58°C/45 seg y 72°C/I min
I	72°C/10 min

zona/gentamicina y 0.5% de agarosa y las microplacas se incubaron a 37°C por 48 horas. Se agregaron a cada pozo 3 ml del mismo medio con 0.22% de rojo neutro en los días segundo o sexto, los períodos de incubación de PNRP para el virus del oeste del Nilo y la encefalitis equina de San Luis, respectivamente. Las placas se contaron 24 horas después y los títulos se expresaron como los recíprocos de la dilución de los sueros que producían menos reducción del número de placas (PNRP90). Todos los sueros se analizaron por duplicado.

Resultados

Presencia del virus del oeste del Nilo en aves. Se encontraron aves seropositivas para el VON. Tres (2.25%) de las 133 muestras de suero de aves colectadas en Lampaños, Nuevo León, resultaron positivas en la prueba de ELISA de bloqueo (cuadro II). En la especie conocida como residente *Passer domesticus* (gorrión doméstico) se demostró la presencia de anticuerpos. Se encontró también seropositividad en *Spizella palida* (gorrión color arcilla), conocida por ser una especie migratoria con hábitos invernales en México. Otra de las especies seropositiva fue *Zonotrichia leucophrys* (gorrión de corona blanca), que también es una especie migratoria.

Presencia del VON en equinos. En octubre de 2002, personal de la CMEUPFAEEA notificó la presencia de caballos con síntomas de encefalitis en el norte de Coahuila. En este estudio se recolectaron las muestras y se analizaron en el laboratorio de microbiología y virología de la UANL. Se utilizó la prueba de ELISA de bloqueo, la cual registró 15 muestras seropositivas al VON (62.5%) (cuadro III). Las muestras se enviaron a la Universidad de Colorado en donde se realizó la prueba confirmatoria de PNRP y sus resultados coincidieron con los de la prueba de bloqueo de ELISA. Es de interés que sólo 20.8% de los equinos mostró síntomas de daño neurológico, como incoordinación, temblores en los flancos y dificultades para caminar. La mayor parte de los equinos provenía de Ciudad Acuña y un menor porcentaje de Jiménez, Coahuila, ambas localidades situadas a menos de 100 km una de la otra, aunque a menos de 50 km de la frontera con Texas.

Pruebas para VON en seres humanos

Para conocer la prevalencia del VON en seres humanos se estandarizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL la detección del RNA viral por medio de RT-PCR y los anticuerpos IgG e IgM contra el VON en muestras de suero y LCR. Todas las muestras se analizaron por RT-PCR y la totalidad fue negativas para el RNA del VON. Sólo se detectaron las bandas de 408 y 193 pb del control positivo mediante el plásmido pCR 4 topo. Los resultados serológicos analizados hasta la fecha muestran que existe una gran reactividad cruzada en los sujetos con probable infección con VON y aquellos que han padecido infección con el virus del dengue. Se incluyeron muestras de suero y LCR de individuos con probable infección por el VON (fiebres y meningoencefalitis asépticas) y muestras de suero de pacientes con infección activa con el virus del dengue (VD) para evaluar el fenómeno de reactividad

Cuadro II
ESPECIES DE AVES SEROPPOSITIVAS AL VON EN LAMPAZOS, NL, (RECOLECCIÓN, 13 A 16 DE ABRIL DEL 2004)

Especie	Nombre común	Familia	Orden	Estatus
Zonotrichia leucophrys	Gorrión de corona blanca	Emberizidae	Passeriformes	Migratorio
Spizella palida	Gorrión color arcilla	Emberizidae	Passeriformes	Migratorio
Passer domesticus	Gorrión doméstico	Passeridae	Passeriformes	Residente

Cuadro III
**RESUMEN DE DATOS SEROLÓGICOS ENCONTRADOS EN EQUINOS ANALIZADOS PARA VON EN COAHUILA, MÉXICO
 (RECOLECCIÓN, ABRIL-MAYO DEL 2004)**

Caballo	Localidad	Síntomas	%* de inhibición por ELISA	PRNP ₉₀ títulos [‡] VON	diagnóstico PRNP
H-1	Cd.Acuña	No	90	>320	VON
H-2	Cd.Acuña	No	5	-	negativo
H-3	Cd.Acuña	No	0	-	negativo
H-4	Cd.Acuña	No	0	-	Negativo
H-5	Cd.Acuña	No	90	>320	VON
H-6	Cd.Acuña	No	93	>320	VON
H-7	Cd.Acuña	No	93	>320	VON
H-8	Cd.Acuña	Sí	93	>320	VON
H-9	Cd.Acuña	Sí	86	>320	VON
H-10	Cd.Acuña	Sí	90	>320	VON
H-11	Cd.Acuña	No	89	>320	VON
H-12	Cd.Acuña	No	92	>320	VON
H-13	Cd.Acuña	Sí	91	>320	VON
H-14	Cd.Acuña	Sí	78	>320	VON
H-15	Jiménez	No	82	>320	VON
H-16	Jiménez	No	25	40	VON
H-17	Jiménez	No	7	-	negativo
H-18	Jiménez	No	93	>320	VON
H-19	Jiménez	No	0	20	negativo
H-20	Jiménez	No	47	40	VON
H-21	Saltillo	No	9	-	negativo
H-22	Saltillo	No	15	-	negativo
H-23	Saltillo	No	12	-	negativo
H-24	Saltillo	No	11	-	negativo

ELISA, ensayo de enzima ligada a un sustrato; PRNP, prueba de neutralización de placas.

*Valores de inhibición $\geq 30\%$ se consideran significativos.

[‡]La presencia de anticuerpos neutralizantes en estos caballos también se reconoció en el Centro para Control de Enfermedades por PNRN.

[§] Denota <20.

cruzada entre los anticuerpos del VON y el VD. Se realizaron pruebas serológicas de ELISA para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra el VON. Hasta la fecha se ha incluido a 44 personas con infección activa por el dengue, 169 pacientes con síntomas clínicos consistentes con fiebre por VON y 24 sujetos con daño en SNC de causa viral (meningitis [12], encefalitis [4], meningo-encefalitis [3] y otros [6]). Estas muestras se analizaron para anticuerpos IgG e IgM. Hasta 40% de los sueros fueron positivos para anticuerpos IgG contra el VON y 0% positivos para anticuerpos IgM contra el VON. Los resultados de la detección de anticuerpos indican que la elevada prevalencia del VD en México (40%) complica el diagnóstico para el VON (cuadro IV). En relación con los resultados del grupo control de pacientes con infección activa por dengue, se encontró que 79.5% de los sueros fue positivo para anticuerpos IgG contra el VON, lo que confirma una reacción cruzada por anticuerpos entre ambos virus.

Discusión

En cuanto a los hallazgos en aves, se demostró la presencia de anticuerpos en la especie *Passer domesticus* (gorrión doméstico), lo cual es importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que esta especie es residente (refs). Este hallazgo indicó por primera vez la actividad viral en niveles prevalentes/endémicos en el norte de Nuevo León (refs). Como dato interesante, se encontró también seropositividad en *Spizella palida* (gorrión color arcilla) conocido por ser una especie migratoria con hábitos invernales en México. Esta especie presenta además actividad de reproducción y veraniega en el norte de Estados Unidos, en Minnesota e Illinois, donde en 2002 se registró gran actividad del VON.²⁹

Cuadro IV

DETECCIÓN DE ACS IgG E IgM CONTRA EL VON EN LAS TRES POBLACIONES DE PACIENTES.

GRUPO A: PACIENTES CON ENFERMEDAD NEUROINVASIVA NO BACTERIANA; **GRUPO B:** PACIENTES CON SÍNTOMAS CONSISTENTES DE FIEBRE POR VON Y VD; Y **GRUPO C:** PACIENTES CON INFECCIÓN POR VD

Pacientes (n)	% IgG positivos	% IgM positivos
Grupo A (24)	41.6	0
Grupo B (169)	40.4	0
Grupo C (44)	79.5	0

La elevada prevalencia de seropositividad en caballos indica que, desde el punto de vista epidemiológico, la cercanía del sur de Estados Unidos es el principal factor de riesgo, dado que en los mismos meses se notificaron en Texas casi 1,800 equinos con comprobada infección al virus del oeste del Nilo; aún más, las ciudades fronterizas de Eagle Pass y Del Río activaron la alarma epidemiológica por la identificación también de equinos infectados. La presencia de éstos antes de identificar aves muertas como indicadores de la llegada del virus no es nueva, toda vez que en Estados Unidos 29% de casi 2,800 condados informaron el mismo patrón epidemiológico, incluso antes del conocimiento de casos humanos.³²

Hasta antes de noviembre de 2002, el reconocimiento del virus del Nilo en México no se había comprobado en seres humanos o equinos. Resultados similares han precedido a los hallazgos de este estudio, en la Península de Yucatán. Farfán y colaboradores (comunicación personal) han encontrado aves, equinos y aun dos probables casos humanos seropositivos al VON. Este punto geográfico en el sur de México es un ecosistema importante dentro de la segunda ruta de migración de aves en Norteamérica. Indudablemente, la llegada del virus del Nilo a México se suma a otras enfermedades emergentes y transmitidas por estos vectores y representan un reto a la investigación y los programas de prevención y control de vectores del sector salud.

Otra observación importante es la gran prevalencia de seropositividad para anticuerpos IgG contra el VON en personas. Se observó que el diagnóstico serológico de pacientes infectados con el VON se complica en la población del norte de México debido a que las pruebas para la detección de anticuerpos sufre reacción cruzada con el virus del dengue, el cual es endémico en esta región. Estos hallazgos concuerdan con los datos de estudios seroepidemiológicos informados hasta el 20 de diciembre de 2006 por la Secretaría de Salud; según estas notificaciones, se registraron 202 casos negativos en sujetos analizados en 24 estados de la República Mexicana entre 2003 y 2006.²⁶

En el caso de las pruebas en seres humanos es necesario realizar un diagnóstico confirmatorio por medio de pruebas de anticuerpos de neutralización en placa o ensayos con microesferas que permitan diferenciar entre varios tipos de flavivirus. La detección del genoma viral en estas muestras permitiría realizar la confirmación de casos positivos, aunque debido a la baja viremia en personas ésta se detecta sólo en 10% de las muestras de suero de pacientes con infección reciente por VON y 55% de las muestras de LCR, lo que complica el diagnóstico de este arbovirus. La vigilancia epidemiológica se realiza aún de manera continua para validar la teoría

de una seroprotección al VON en sujetos con infecciones previas por VD.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo otorgado por el CONACYT (proyecto NL-2003-CO4-12553) a la Dra. Ana María Rivas Estilla y al Dr. Ildefonso Fernández Salas. Agradecemos a la QBP María Isabel Tavitas Aguilar, del Laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud del estado de Nuevo León y al personal de los Departamentos de Neurología e Infectología del Hospital Universitario de la UANL por su colaboración.

Referencias

1. Charrel RN, Brault AC, Gallian P, Lemasson J, Murgue B, Murri SJ, et al. Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology* 2003;315(2):381-388.
2. Solomon T, Ooi MH, Beasley DW, Mallewa M. West Nile encephalitis. *Bmj* 2003;326(7394):865-869.
3. Meek J. West Nile virus in the United States. *Curr Opin Pediatr* 2002;14(1):72-77.
4. Smithburn KC, Bugher JC. Ultrafiltration of recently isolated neurotropic viruses. *J Bacteriol* 1953;66(2):173-177.
5. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul AJ. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 1940;20:471-492.
6. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 2005;11(8):1167-1173.
7. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 2005;11(8):1174-1179.
8. Granwehr BP, LillibrIDGE KM, Higgs S, Mason PW, Aronson JF, Campbell GA, et al. West Nile virus: where are we now? *Lancet Infect Dis* 2004;4(9):547-556.
9. Update: West Nile virus activity--United States, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005;54(34):851-852.
10. Beasley DW, Whiteman MC, Zhang S, Huang CY, Schneider BS, Smith DR, et al. Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage I West Nile virus strains. *J Virol* 2005;79(13):8339-8347.
11. Weiss D, Carr D, Kellachan J, Kellachan J, Tan C, Phillips M, et al. Clinical findings of West Nile virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001;7(4):654-658.
12. Brinton MA. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol* 2002;53:371.
13. Prince HE, Hogrefe WR. Detection of West Nile virus (WNV)-specific immunoglobulin M in a reference laboratory setting during the 2002 WNV season in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(5):764-768.
14. Martin DA, Noga A, Kosoy O, Johnson AJ, Petersen LR, Lanciotti RS. Evaluation of a diagnostic algorithm using immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate human West Nile Virus and St. Louis Encephalitis virus infections during the 2002 West Nile Virus epidemic in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11(6):1130-1133.
15. Wong SJ, Boyle RH, Demarest VL, Woodmansee AN, Kramer LD, Li H, et al. Immunoassay targeting nonstructural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue and St. Louis encephalitis virus infections and from flavivirus vaccination. *J Clin Microbiol* 2003;41(9):4217-4223.
16. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, et al. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38(11):4066-4071.
17. Shirato K, Miyoshi H, Kariwa H, Takashima I. Detection of West Nile virus and Japanese encephalitis virus using real-time PCR with a probe common to both viruses. *J Virol Methods* 2005;126(1-2):119-125.
18. Komar N, Panella NA, Burns JE, Dusza SW, Mascarenhas TM, Talbot TO. Serologic evidence for West Nile virus infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999. *Emerg Infect Dis* 2001;7(4):621-625.
19. Nasci RS, Savage HM, White DJ, Miller JR, Cropp BC, Godsey MS, et al. West Nile virus in overwintering Culex mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001;7(4):742-744.
20. Ostlund EN, Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Williams WO, Schmitt BJ. Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg Infect Dis* 2001;7(4):665-669.
21. Blitvich BJ, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero JF, Marlenee NL, Gonzalez-Rojas JI, Komar N, et al. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2003;9(7):853-856.
22. Lorono-Pino MA, Blitvich BJ, Farfan-Ale JA, Puerto FI, Blanco JM, Marlenee NL, et al. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2003;9(7):857-859.
23. Elizondo-Quiroga D, Davis CT, Fernandez-Salas I, Escobar-Lopez R, Velasco Olmos D, Soto Gastalum LC, et al. West Nile Virus isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2005;11(9):1449-1452.
24. Blitvich BJ, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero JF, Lorono-Pino MA, Marlenee NL, Diaz FJ, et al. Phylogenetic analysis of West Nile virus, Nuevo Leon State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2004;10(7):1314-1317.
25. Deardorff E, Estrada-Franco J, Brault AC, Navarro-López R, Campomanes-Cortes A, Paz-Ramírez P, et al. Introductions of West Nile virus strains to Mexico. *Emerg Infect Dis* 2006;12(2):314-318.
26. CENAVE, Secretaría de Salud de México. Febrero de 2007. Disponible en: <http://www.cenave.gob.mx/von/default.asp>.
27. Peterson RT. First Guide to Birds of North America. 3rd ed. Washington DC: National Geographic, 2001 .
28. Hall RA, Broom AK, Hartnett AC, Howard MJ, Mackenzie JS. Immunodominant epitopes on the NS1 protein of MVE and KUN viruses serve as targets for a blocking ELISA to detect virus-specific antibodies in sentinel animal serum. *J Virol Methods* 1995;51(2-3):201-210.
29. Prince HE, Lape'-Nixon M, Moore RJ, Hogrefe WR. Utility of the focus technologies west nile virus immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for testing cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2004;42(1):12-15.
30. Tilley PA, Walle R, Chow A, Jayaraman GC, Fonseca K, Drebot MA, et al. Clinical utility of commercial enzyme immunoassays during the inaugural season of West Nile virus activity, Alberta, Canada. *J Clin Microbiol* 2005;43(9):4691-4695.
31. Shi PY, Kauffman EB, Ren P, Felton A, Tai JH, Dupuis AP, et al. High-throughput detection of West Nile virus RNA. *J Clin Microbiol* 2001;39(4):1264-1271.
32. Johnson DJ, Ostlund EN, Pedersen DD, Schmitt BJ. Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Emerg Infect Dis* 2001;7(4):739-741.