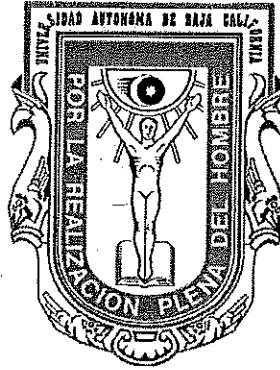


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**DIAGNÓSTICO MOLÉCULAR DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DEL OESTE
DEL NILO EN LA CIUDAD DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.**

TESIS

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLÉCULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ DE JESÚS RAMÍREZ VÁZQUEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. DICIEMBRE DE 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLÉCULAR Y BIOTECNOLOGÍA

DIAGNÓSTICO MOLÉCULAR DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DEL OESTE
DEL NILO EN LA CIUDAD DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLÉCULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ DE JESÚS RAMÍREZ VÁZQUEZ

JURADO CALIFICADOR



Dra. Amelia Portillo López
Presidente



Dra. Ivone Giffard Mena
Primer vocal



Dr. Gorgonio Ruíz Campos
Secretario

DEDICATORIA

*A mis padres Juan Ramírez Pérez (+) y Teresa Vázquez Wáñez
Por haberme enseñado la importancia de la responsabilidad.*

*A mi hermana Ruth y Francisco
(su esposo) por el apoyo prestado todos estos años.*

*A mi directora de tesis Amelia Portillo
por haberme involucrado en esta aventura científica en la cual
siempre quise estar involucrado, aunque nunca es tarde...*

AGRADECIMIENTOS

Le doy mil gracias a la Dra. Amelia Portillo López por haberme enseñado tantos conocimientos y consejos. Y por su paciencia en mi formación.

Agradezco al Dr. Gorgonio Ruiz Campos por su apoyo durante mi trabajo en la colecta e identificación de aves, mil gracias.

Gracias a la Dra. Ivone Giffard Mena por sus atinadas correcciones.

Mil Gracias a Ángel Pulido Capiz, estudiante de Biología por mostrar interés en este trabajo y en haberme acompañado en la colecta e identificación de mosquitos.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme proporcionado el soporte económico durante mis estudios de Maestría.

Gracias por el apoyo de financiamiento otorgado en la 13va convocatoria interna de la Universidad Autónoma de Baja California y a PROMEP.

A la Facultad de Ciencias, UABC por haberme permitido realizar mi tesis en sus instalaciones.

Agradezco al Dr. Pedro Antonio Victoria por haberme proporcionado las muestras de sangre del Hospital General de Ensenada, B.C., mil gracias.

Le doy las gracias a mis compañeros de posgrado: Marco Antonio Ponce Márquez, René J. Casarez por su amistad y compañerismo durante esta aventura científica.

RESUMEN

El Virus del Oeste del Nilo (VON) es un retrovirus perteneciente a la familia Flaviviridae, los integrantes de este grupo se caracterizan por ser transmitidos por artrópodos hematófagos. El VON es el agente causal de encefalitis y/o meningitis en los huéspedes susceptibles como son; aves, equinos, humanos, entre otros. El principal vector del VON son los mosquitos del género *Culex*.

En este trabajo se analizó la presencia del VON en mosquitos, aves y humanos en la ciudad de Ensenada, Baja California, durante la primavera y verano de 2009. Se utilizaron pruebas comerciales como VecTest y anticuerpos anti VON-IgM, las muestras positivas se confirmaron por la técnica molecular de RT-PCR. Se obtuvieron resultados positivos en una estación de muestreo, en ella se encontraron las siguientes especies de mosquitos: *Culex pipiens*, *Anopheles punctipennis* y *Psophora ciliata*. De las aves analizadas (*Euphagus cyanocephalus*, *Larus occidentalis*, *Passer domesticus*, *Pipilo crissalis*, *Gallus gallus*, *Tyto alba* y *Carpodacus mexicanus*) todas resultaron negativas. En cuanto a la detección de anticuerpos anti VON-IgM en suero sanguíneo humano, todas las muestras fueron negativas. Este trabajo contribuye con el diagnóstico de la presencia del VON en la ciudad de Ensenada, lo cual indica que existe un probable riesgo epidemiológico, por lo que se hace el exhorto a tomar medidas preventivas de fumigación en cuerpos de agua y a evitar el acumulamiento de agua en las aéreas residenciales.



Vo.Bo Dra. Arriela Portillo López
Director de Tesis

CONTENIDO

I. INTRODUCCION	1
II. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	13
III. OBJETIVOS	14
IV. METODOLOGIA	15
IV.1. DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO	15
IV.2. RECOLECCION DE MOSQUITOS	17
IV.2.1. IDENTIFICACIÓN DE MOSQUITOS:.....	17
IV.3. DETECCION DEL VON CON EL KIT VecTest	17
IV.4. EXTRACCION DE ARN VIRAL	20
IV.5. REVERSO TRANSCRIPCIÓN DE ARN VIRAL	20
IV.6. DETECCION DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO POR PCR ANIDADA	20
IV.7. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DEL VON PRESENTE EN ENSENADA.	21
IV.8. PROTOCOLO DEL KIT QIAQUICK (QIAGEN®) PARA PURIFICAR EL PRODUCTO DE PCR DEL GEL DE AGAROSA	22
IV.9. CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR, AMPLIFICADO CON LOS CEBADORES NS5	22
IV.10. TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS COMPETENTES DE E.coli, (cepa DH5 α) Y SELECCIÓN DE CLONAS POSITIVAS.	22
IV.11. DETECCIÓN DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO (VON) POR EL MÉTODO DE ELISA.	23
V. RESULTADOS	24
V.1. ANÁLISIS DE MOSQUITOS:	24
V.2. ANÁLISIS EN SUERO SANGUÍNEO HUMANO:	28
V.3. ANÁLISIS DE AVES	30
VI. DISCUSION	31
VII. CONCLUSIONES	40
VIII. RECOMENDACIONES	41
IX. LITERATURA CITADA	42
X. APÉNDICES	51

LISTA DE TABLAS

No. de tabla		Página
I	Función de las proteínas de los <i>flavivirus</i> .	3
II	Mosquitos de Norte América con potencial de transmisión de VON.	9
III	Estaciones de muestreo.	15
IV	Resultados de detección del VON en mosquitos por la técnica de VecTest.	22
V	Resultado de las absorbancias obtenidas en la técnica de ELISA anti-VON IgM de las muestras analizadas.	29
VI	Resultado de la detección del VON en aves.	30

LISTA DE FIGURAS

No. de Figura		Página
1	Ciclo de transmisión del Virus del Oeste del Nilo.	8
2	Estaciones de muestreo.	16
3	Interpretación de resultados de la prueba de VecTest.	19
4	Gel de Poliacrilamida (6%) que muestra el resultado de PCR anidado.	26
5	Gel de Poliacrilamida al 6% que muestra el resultado de PCR para la identificación de linaje del VON.	27

I. INTRODUCCION

El Virus del Oeste del Nilo (VON) es un virus de la familia Flaviviridae, esta incluye a tres géneros; Flavivirus (VON), Pestivirus y Hepacivirus. Los virus pertenecientes a los flavivirus como el VON se caracterizan por ser transmitidos por artrópodos en su mayoría y son los agentes causales de encefalitis y/o meningitis en los huéspedes (vertebrados). Este género está dividido en doce sero complejos que incluyen el virus del dengue, la encefalitis japonesa, Casipacore, Koutango, encefalitis del Valle de Murray, encefalitis de San Luis, Usutu y la virosis Yaounde. El virus Kunjin, el cual es endémico en Australia es actualmente considerado como un subtipo del VON. La secuenciación del genoma del VON y la realización de estudios filogenéticos han demostrado que el VON está dividido en dos linajes genéticos mayores. El linaje 1 tiene una distribución mundial e incluye una virosis atenuada y virulenta. El linaje 1 se ha dividido además en tres clases: Clase 1a, que contiene aislados de África, Europa, Asia y las Américas; clase 1b, en el cual está el virus Kunjin; clase 1c que contiene los aislados de India. El linaje 2 que antes era exclusivo de África y que está asociado con infecciones asintomáticas, se ha aislado recientemente en Europa (CDC, 2003; Trevejo *et al.*, 2008).

El VON es una partícula esférica recubierta de aproximadamente 50 nm de diámetro y cuya simetría es icosaédrica. La envoltura consiste de una bicapa lipídica derivada del huésped y 180 copias de proteínas de la envoltura (E) y membrana (M). Ambas proteínas están embebidas en la bicapa lipídica vía su dominio carboxilo terminal transmembranal. La proteína M es generada a partir

de su precursor (prM), por un rompimiento proteolítico mediado por una Furina en la etapa tardía de la maduración del virus. La proteína prM y la E interactúan para formar heterodímeros que están presentes en la superficie del virus como 60 picos trimeritos. El rompimiento de la proteína prM capacita a la proteína E para formar homodímeros de la cabeza al tallo y se encuentran en paralelo a la bicapa lipídica. La envoltura rodea a la nucleocapside, la que a su vez esta compuesta de múltiples copias de la proteína de la cápside (C) y de una copia del genoma. El genoma del VON es ARN de cadena sencilla de sentido positivo, de aproximadamente 11 Kb, codifica a tres proteínas estructurales (cápside, membrana, envoltura) y siete proteínas no estructurales 5' -C-prM (M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5- 3' en un solo marco de lectura abierto (Tabla I).

Tabla I. Función de las proteínas de los flavivirus.

Proteínas	PM (kDa)	Función
C	11	Se asocia con el ARN geonómico en la núcleo capsíde
prM	26	Protege a E de sufrir un cambio conformacional irreversible mientras el virión es secretado a través de compartimientos acidificados.
M	10	Se desconoce
E	53	Receptor de unión, fusión de membrana al huésped, ensamblaje viral, mejor determinante antigénico.
NS1	46	Actividad de cofactor para la replicasa viral.
NS2A	22	Inhibe las respuestas del interferón, ensamblaje viral y liberación.
NS2B	14	Cofactor para la actividad de la proteasa NS3.
NS3	70	Serina proteasa, bloqueo de ARN, helicasa.
NS4A	16	Modula la señalización del interferón.
NS4B	27	Modula la la señalización del interferón.
NS5	103	ARN polimerasa dependiente de ARN, metiltransferasa.

PM, peso molecular; C, capsíde; prM, pre-membrana; M, membrana, E, envoltura; NS, no estructural (Blitvich, 2008)

El Virus del Oeste del Nilo se identificó por primera vez en 1937 en una mujer febril en Uganda, proveniente del Oeste del río Nilo (Smithburn *et al.*, 1940). Posteriormente se registraron casos de encefalitis en humanos por VON en Israel en 1957, desde entonces se han notificado epidemias en África, Europa y Medio Oriente. En 1999, en Nueva York se comunicó un brote de encefalitis en seres humanos que coincidió con brotes en cuervos y aves con elevada tasa de mortalidad, este evento marcó la llegada del VON al continente Americano (Blitvich, 2008). Durante los seis años siguientes se han presentado brotes anuales a lo largo de Estados Unidos de América (EUA), Canadá, El

Caribe y Latinoamérica (Charrel *et al.*, 2003). Tan sólo en EUA se han reportado más de 100 especies diferentes de aves infectadas y 43 especies de mosquitos portadores (Fernández-Salas *et al.*, 2007).

En seres humanos tan solo en los Estados Unidos de América se han notificado 29,624 casos con 1,161 defunciones los cuales han ocurrido de 1999 a 2009 (CDC, 2010). Con el tiempo el número de casos de infección por VON se ha incrementado, situación que indica que la infección por VON se mantiene en evolución y que este virus se establece como endémico y epidémico en esta área geográfica (Granwehr *et al.*, 2004; Fernández-Salas *et al.*, 2007).

En México se ha detectado el VON en aves en Baja California, Nuevo León, zoológicos de Tabasco y Yucatán, en mosquitos en Mexicali, Baja California y Nuevo León, en caballos en Baja California, Coahuila, Nuevo León y Yucatán y en reptiles en Tabasco y Yucatán, así como en otros mamíferos en el zoológico de Yucatán. Los casos confirmados en humanos en México han sido siete, 4 en Chihuahua, 2 en Sonora y 1 en Nuevo León (Blitvich *et al.*, 2003; Rappole *et al.*, 2003; Ramos y Falcón, 2004; Deardorff, 2006).

La infección en humanos se caracteriza por una serie de síntomas inespecíficos los cuales no pueden ser diferenciados clínicamente de otras enfermedades infecciosas. Estos síntomas incluyen un inicio abrupto de fiebre, dolor de cabeza, mialgias (dolores musculares), náusea, fatiga, sensación de debilidad, vómito y diarrea. Usualmente los síntomas se desarrollan de 2 a 14 días después de la infección viral. La enfermedad dura de 2 a 5 días, pero en los casos severos se observa que la fatiga puede persistir hasta un mes.

Aproximadamente 1 de cada 150 pacientes (<1%) infectados con VON presentaran enfermedad neuroinvasiva severa, esta se caracteriza por encefalitis, meningitis y/o poliomielitis (como parálisis flácida). En cuanto a los desenlaces fatales estos son en promedio del 10% y las secuelas a largo plazo ocurren en más del 50% de los pacientes y raramente se reporta en pacientes de edades menores de 30 años (Davis *et al.*, 2006; Sejvar *et al.*, 2006, 2007 Blitvich; 2008).

En caballos las infecciones por VON generalmente son asintomáticas: se observaron signos clínicos únicamente en el 8% de los casos positivos. La enfermedad se caracteriza por fiebre y una variedad de signos neurológicos tales como ataxia (pérdida de coordinación motriz), debilidad muscular y amaurosis (pérdida de la visión por inflamación cerebral). Las lesiones en tejidos extra neurales son raramente detectadas. En estos animales, la enfermedad dura aproximadamente 3 semanas, con un rango de mortalidad del 23 al 43%. La vacunación para prevenir la encefalitis equina reduce el riesgo de muerte en un 44% y presenta protección hacia los otros flavivirus. Los caballos se han utilizado como centinelas para estimar el riesgo de infecciones humanas de algunas virosis provenientes de mosquitos, como la encefalitis equina del virus occidental. Los casos clínicos de VON en caballos no se transmiten a humanos en la misma área (Salazar *et al.*, 2004; Corrigan *et al.*, 2006.).

En las aves la patología se caracteriza por varios signos neurológicos, incluyendo ataxia, parálisis y falta de coordinación sumados a varios signos no

neurólógicos tales como depresión, letargia (estado de somnolencia profunda y prolongada), plumas erizadas, pérdida de peso y miocarditis (inflamación del corazón). Los pájaros infectados por VON mueren frecuentemente durante las primeras 24 horas desde el establecimiento de los signos clínicos. La vigilancia de pájaros muertos ha demostrado ser un sistema de alarma temprana eficiente para detectar el VON en humanos. En contraste con los caballos, la infección del VON en pájaros causa lesiones en múltiples tejidos y/u órganos; los infectados con mayor frecuencia son los riñones, hígado, corazón y bazo. Con excepción de caballos y pájaros, el VON no es un patógeno común en otros vertebrados. Sin embargo, la enfermedad neurológica ha sido diagnosticada en ardillas, hámster, perros, lagartos y ratones. Estos últimos se han utilizado como modelos de laboratorio para el estudio de encefalitis inducida por VON (Blitvich, 2008).

El VON al igual que muchos otros arbovirus tiene dos ciclos distintos de transmisión; un primer ciclo que es enzootico (o ciclo de amplificación) que involucra un grupo de vectores y aves huésped. El ciclo secundario que involucra potencialmente diferentes artrópodos, humanos y caballos (Fig. 1). En el ciclo primario los mosquitos ornitofílicos, como *Culex pipiens*, se alimentan de pájaros virémicos (huéspedes amplificadores), a partir del cual se infectan para posteriormente transmitir el virus a los demás huéspedes amplificadores. Si existen las condiciones propicias (temperatura, mosquitos vectores, densidad alta de población de mosquitos, número de huéspedes susceptibles, etc.) se produce una epizootia en las aves. Si muchas aves

resultan infectadas esto no necesariamente termina en enfermedad en humanos o equinos. Los vectores primarios más eficientes de transmisión son aquéllos que se alimentan de aves que desarrollan un alto nivel de viremias. Estos mosquitos pueden representar una gran amenaza para humanos y equinos, y cuando es así, a estos mosquitos se les considera mosquito puente entre el ciclo ornitofílicos y los demás vertebrados, los cuales son huéspedes incidentales y producen viremias de magnitud insuficiente para infectar a otros mosquitos. Generalmente un vertebrado infectado debe producir una viremia $\geq 10^5$ pfu.ml⁻¹ (pfu= unidades formadoras de placa) para servir como reservorio (Xiao *et al.*, 2001; Blitvich, 2008).

Los mosquitos vectores del VON que se han considerado más importantes son los del género *Culex*, principalmente *C. pipiens*, aunque otras especies como *C. quinquefasciatus*, *C. restuans*, *C. nigripalpus* y *C. salinarius* son considerados (Kulasekera *et al.*, 2000; Turell *et al.*, 2001; Goddard *et al.*, 2002; DiMenna *et al.*, 2006; Richards *et al.*, 2007; Styer *et al.*, 2007; Trevejo *et al.*, 2008). No obstante, Turell y colaboradores (2005), demostraron en laboratorio que otros géneros de mosquitos, como los que se señalan en la Tabla II, presentaron una capacidad de transmisión alta cuando se infectaron con gallinas inoculadas con VON y después se expusieron a aves susceptibles.

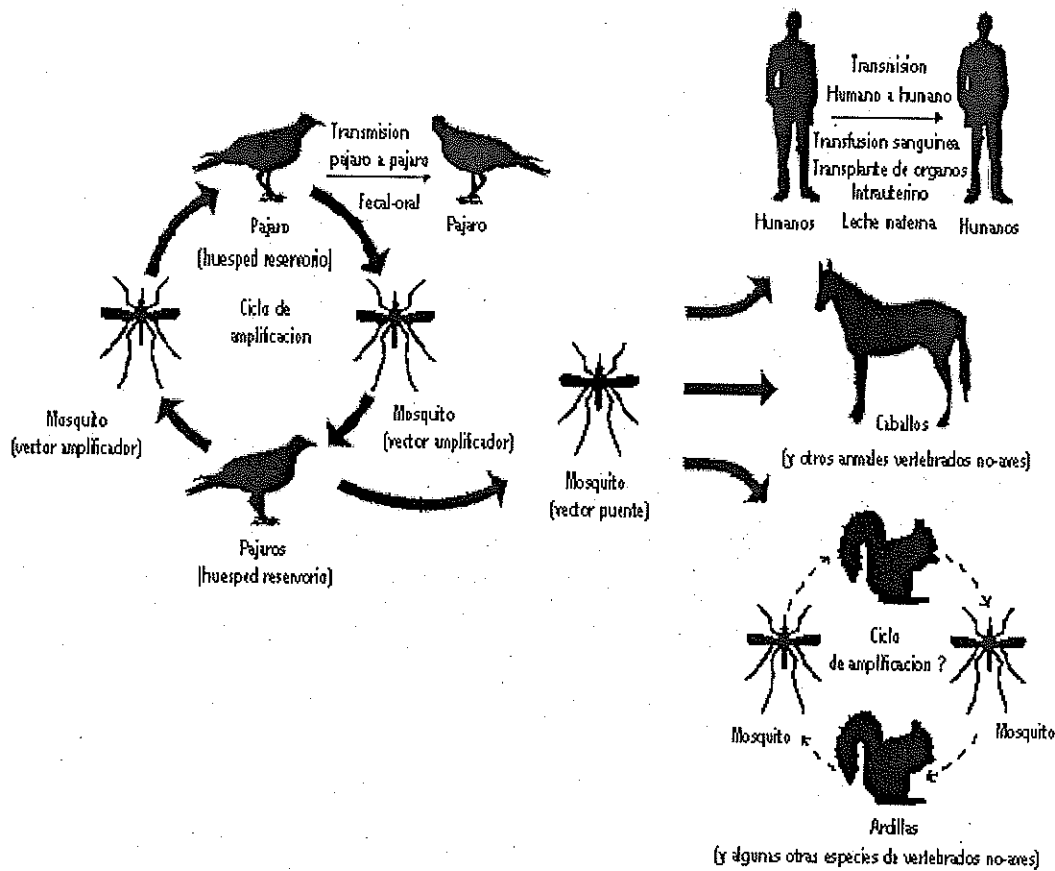


Fig. 1. Ciclo de transmisión del Virus del Oeste del Nilo. Las flechas sólidas muestran las rutas comunes, las flechas delgadas muestran las rutas de transmisión infrecuentes, las flechas punteadas muestran las rutas propuestas de transmisión en la naturaleza que no han sido confirmadas (Blitvich, 2008).

Tabla II. Mosquitos de Norte América con potencial de transmisión de VON (Turell *et al.*, 2001)

Especies	Aislamiento de VON ^a en campo	Preferencia/Huésped	Competencia del vector por el VON ^b	Potencial como vector puente ^c
<i>Aedes albopictus</i>	+	Oportunista	++++	++++
<i>A. vexans</i>	+++	Mamíferos	+	++
<i>C. nigripalpus</i>	0	Oportunista	++	++
<i>C. pipiens</i>	+++++	Pájaros	+++	++
<i>C. quinquefasciatus</i>	0	Pájaros	+++	++
<i>C. restuans</i>	+++	Pájaros	++++	++
<i>C. salinarius</i>	+++	Oportunistas	++++	++++
<i>Ochlerotatus atropalpus</i>	0	Mamíferos	++++	++
<i>O. canadensis</i>	0	Mamíferos	+	+
<i>O. cantor</i>	+	Mamíferos	+	+
<i>O. japonicus</i>	+++	Oportunista	++++	++++
<i>O. sollicitans</i>	0	Grandes mamíferos	++	+
<i>O. taeniorhynchus</i>	0	Grandes mamíferos	+	+
<i>O. triseriatus</i>	+++	Mamíferos	+++	+++

^a Grupos detectados con VON 0= ninguno; += uno; +++++ = muchos.

^b Eficiencia con la cual esta especie es capaz de transmitir VON en el laboratorio:

0= incompetente; + = ineficiente; ++++ = Extremadamente eficiente.

^c Potencial para estas especies como vector puente. 0= poco a ningún riesgo, +++++ = el mayor rol.

En México los estudios de vectores de transmisión del VON involucraron a las siguientes especies de mosquitos (CENAVE, Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica): *Aedes vexans*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Culiseta insidens*, *C. pipiens*, *C. tarsalis*, *C. quinquefasciatus*, *C. interrogator*, *C. stigmatosoma*, *C. thriambus*, y *Psophora toltecum*.

En cuanto a los efectos ambientales se ha observado que la temperatura y las lluvias influyen los ciclos de transmisión de los arbovirus. Varios estudios de laboratorio han demostrado que los mosquitos son vectores más eficientes de flavivirus cuando se les mantiene en temperaturas elevadas, *C. pipiens* ha sido un vector significativamente más eficiente cuando es mantenido a 30° C en lugar de 18, 20, o 26° C (Turell *et al.*, 2001). Los mosquitos también difieren en requerimientos de hábitat, por ejemplo: *C. pipiens* es considerado una especie urbana y suburbana, *C. restuans* es común en áreas rurales y urbanas y *C. tarsalis* es considerado un vector rural primario del VON. (DeGroot *et al.*, 2008).

La asociación entre áreas urbanas y casos humanos positivos indica que las áreas urbanas y suburbanas favorecen las condiciones para que ocurra la transmisión enzootica y puente. Asimismo, se sabe que el mosquito se cría en aguas ricas en materia orgánica de contenedores artificiales en áreas urbanas, lo cual indica un foco urbano (Turell *et al.*, 2001; Molaei *et al.*, 2007; DeGroot *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2008;). Además se ha observado que *C. pipiens* exhibe tardíamente un cambio de huésped hacia el humano al final de la estación de verano. La asociación entre las áreas urbanas/suburbanas y los

casos de VON en humanos indican un aumento en las condiciones óptimas para las formas de transmisión enzooticas y de puente. Por otro lado, se ha asociado a los casos de VON en humanos en residencias aledañas a áreas verdes (Brown *et al.*, 2008).

La infección por VON se reconoce actualmente como la mayor epidemia de enfermedad neuroinvasiva arboviral en el hemisferio occidental, ya que el virus ha causado de forma continua y significativa una mortalidad y morbilidad en EUA con mas de 2,500 casos cada año en humanos en los años de 2002 a 2007 (Blitvich, 2008). El aumento de casos en 2002 coincide con el surgimiento de un nuevo genotipo del VON (VON02). Este genotipo fue descrito por primera vez cuando se obtuvo la secuencia del gen E de 67 aislados de Nueva York en 2002-2003. Posteriormente se utilizó el gen NS5 en 39 aislados (Ebel *et al.*, 2004). El VON02 represento el 55% de los analizados en 2003, poco después se demostró que VON02 había emergido como el genotipo dominante del VON en todos los Estados Unidos de América y Canadá. El genotipo temprano (NY99) no había sido detectado en Norte América desde 2004 lo cual sugiere que había sido completamente desplazado por el VON02. Todos los virus con el genotipo VON02 contienen 13 mutaciones cuando se comparan con el prototipo de la cepa VON-NY99 incluyendo una mutación no sinónima localizada en E-159. Además el tiempo de incubación del genotipo viral VON02 en los mosquitos de las especies *Culex* es de 4 días, más corto que en el genotipo NY99 el cual es de 14 días (Blitvich, 2008).

Desde el 2002 la vigilancia de la infección en equinos y aves ha demostrado una extensa circulación de VON en México y el Caribe, y posteriormente se detectó por primera vez en Centroamérica, identificándose caballos seropositivos (Loroño-Pino *et al.*, 2003).

En Latinoamérica el primer virus de VON fue aislado en México y se obtuvo de un pájaro muerto en el 2003, este virus poseía el genotipo VON02 y contenía un cambio en el aminoácido E-156 el cual no presentaba una glicosilación altamente conservada en otros VON, el cambio de éste aminoácido no se había observado en todos los clones, lo cual sugiere una población mixta de virus. Las variantes glicosiladas fueron altamente letales en ratones mientras que las variantes no glicosiladas fueron atenuadas (Blitvich, 2008). Desde entonces otros 15 VONs (12 de México, y 3 de Argentina) se han identificado y secuenciado (Beasley *et al.*, 2004; Elizondo-Quiroga *et al.*, 2005; Deardorff *et al.*, 2006).

Cabe señalar que la detección del VON no necesariamente involucra su genotipificación, ya que se requiere de un laboratorio de nivel II de bioseguridad para su cultivo y obtención de ARN y ADNc suficiente para poder secuenciarlo. En los casos los genotipos evaluados en México, estos se llevaron a cabo en Estados Unidos de América.

II. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

El Virus del Oeste del Nilo es el agente causal de la enfermedad conocida como Fiebre del Oeste del Nilo, aunque la enfermedad no es severa en el 20% de los casos, recientemente ha causado mortalidad importante en las personas susceptibles como son los niños, ancianos y personas inmuno comprometidas. La vigilancia epidemiológica es fundamental para determinar tanto la presencia como la dispersión del patógeno y sus genotipos, dentro de los cuales podemos encontrar unos más agresivos que otros.

El presente trabajo evaluó de forma preliminar la presencia del VON en la zona urbana y sub-urbana de Ensenada, Baja California, México para establecer la necesidad de una vigilancia epidemiológica en esta área.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general:

Demostrar la presencia del VON en la ciudad de Ensenada, B. C. México.

III.2. Objetivos particulares:

III.2.1. Realizar un diagnostico molecular del VON en mosquitos, aves, caballos y humanos.

III.2.2. Identificar los organismos positivos al VON.

III.2.3. Corroborar la presencia del VON en las muestras positivas mediante RT-PCR.

IV. METODOLOGIA

IV.1. DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO

Los muestreos se llevaron a cabo en la ciudad de Ensenada B.C. la cual se encuentra localizada a 32° 52' de latitud Norte y a 116° 37' de longitud Oeste, posee un clima mediterráneo cálido y seco, con precipitaciones durante el invierno. En la figura 2, se señalan las estaciones de muestreo y en la Tabla III sus características.

Tabla III. Estaciones de muestreo.

Estación	Coordenadas geográficas	Características de la Zona
1. La presa Emilio López Zamora	31°53'54.54"N 116°35'53.59"W	Cuerpo de agua rodeada de vegetación, zona urbana.
2. El cañón de Doña Petra	31°54'20.13"N 116°36'24.55"W	Área verde, riachuelo . producto de aguas domesticas tratadas, estancamientos.
3. Playa municipal	31°50'42.47"N 116°36'47.65"W	Zona urbana con caballerizas, descarga de aguas negras municipales tratadas.
4. Campo de golf, Baja Country Club.	31°45'46.78"N 116°32'5.93"W	Zona sub-urbana con cuerpos de agua, áreas verdes.
5. Punta morro-UABC	31°51'43.01"N 116°40'7.76"W	Zona urbana costera
6. CICECE	31°52'7.90"N 116°39'52.62"W	Zona urbana

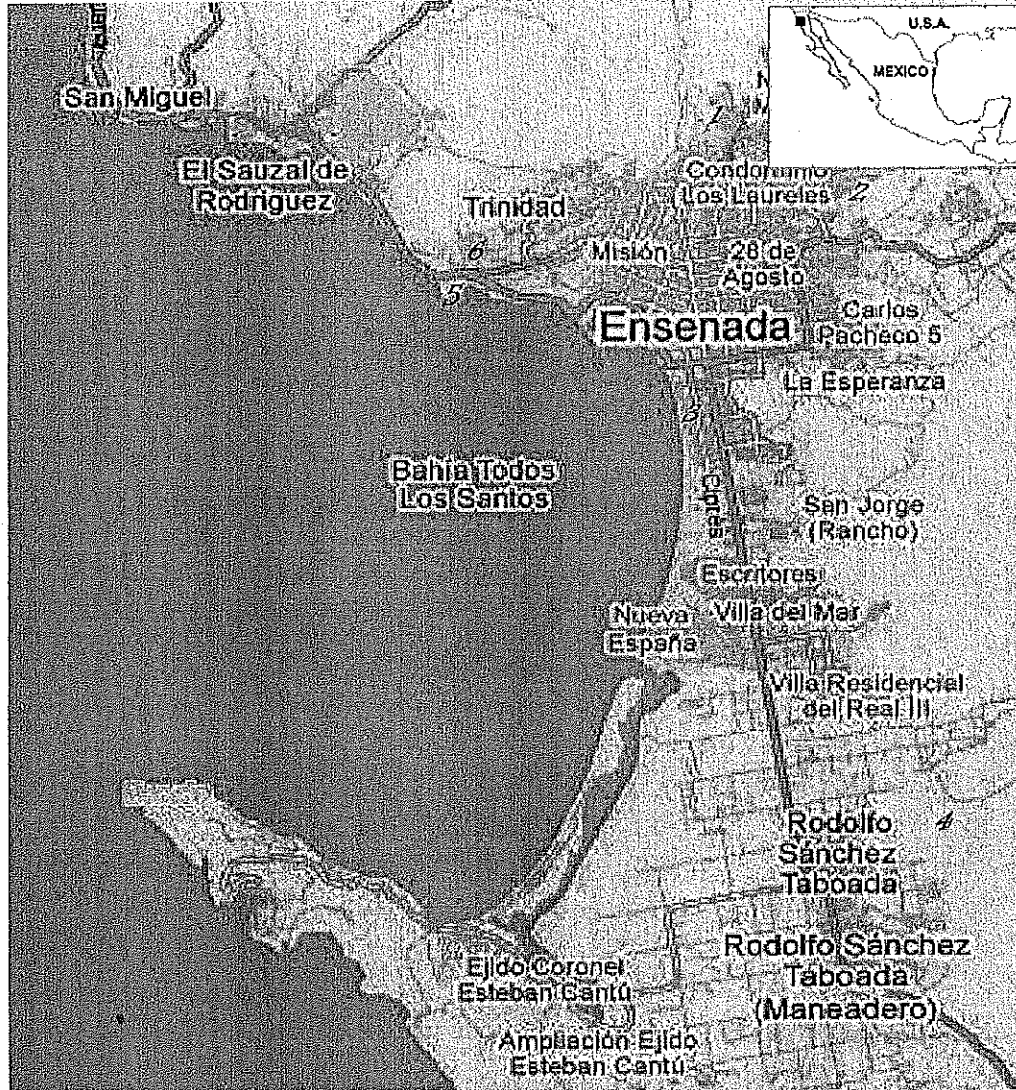


Figura 2. Estaciones de muestreo. 1) Presa Emilio López Zamora, 2) cañón de Doña Petra, 3) playa municipal, 4) campo de golf "Baja Country Club", 5) Punta Morro-UABC, 6) CICECE.

IV.2. RECOLECCION DE MOSQUITOS.

Se llevaron a cabo recolecciones de mosquitos durante primavera-verano del 2009. Estos muestreos se realizaron en las estaciones 1-5, como se indica en la figura 2 y tabla III.

Para la captura de mosquitos se utilizaron redes entomológicas y una trampa de luz (CO₂-CDC miniature light trap modelo 512, John W. Hock). Las recolectas se realizaron durante el atardecer, dejándose la trampa por un periodo de 8-12 hrs. Los mosquitos fueron colocados en recipientes etiquetados con fecha y lugar de recolecta y se guardaron a -80 °C hasta su análisis. Una muestra de mosquitos de cada área se preservó en alcohol etílico al 70% para su identificación taxonómica.

IV.2.1. IDENTIFICACIÓN DE MOSQUITOS:

Se analizaron los mosquitos bajo un microscopio estereoscópico Carl Zeiss (Stemi DV4). Se agruparon por sexo y especie de acuerdo a sus características morfológicas para lo cual se utilizaron claves de identificación (Carpenter y LaCasse, 1974; Darsie y Ward, 2004).

IV.3. DETECCION DEL VON CON EL KIT VecTest

Se utilizó el kit VecTest (Microgenics Corporation®) con ligeras modificaciones para la detección del VON en mosquitos y aves (cerebro y faringe).

Bajo observación en un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss, Stemi DV4) se seleccionaron los mosquitos hembras de cada estación de muestreo, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se agregaron 250 µL

de la solución de molienda proveída en el kit VecTest. Se llevó a cabo la molienda de los mosquitos utilizando un homogeneizador de tejidos micro grinder (Res. Products Inter. Corp. ®) a máxima velocidad por periodos de 30 segundos, 5 veces cada una, en una cama de hielo. Se dejó 5 minutos y después se añadieron 250 ml de solución de molienda, se mezcló por vortex por espacio de 30 segundos. El homogeneizado se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm en una micro centrifuga (Eppendorf, modelo 5415 C) a una temperatura de 4°C, del sobrenadante se tomaron 250 µL y se pusieron en un microtubo nuevo y se colocó una tira reactiva VecTest y se dejó 15 min. a temperatura ambiente. Se interpretó el resultado siguiendo las instrucciones del kit VecTest (Fig. 3). Los resultados se leyeron antes de 30 min. Se guardó el resto del sobrenadante de las muestras positivas a una temperatura de -70 °C, para posteriormente extraer el RNA viral y realizar la transcripción reversa y la reacción de PCR para la confirmación de la presencia del virus. En el caso de las aves, se procedió a extraer el cerebro y un fragmento de 50 mg fue tratado de igual forma que los mosquitos.

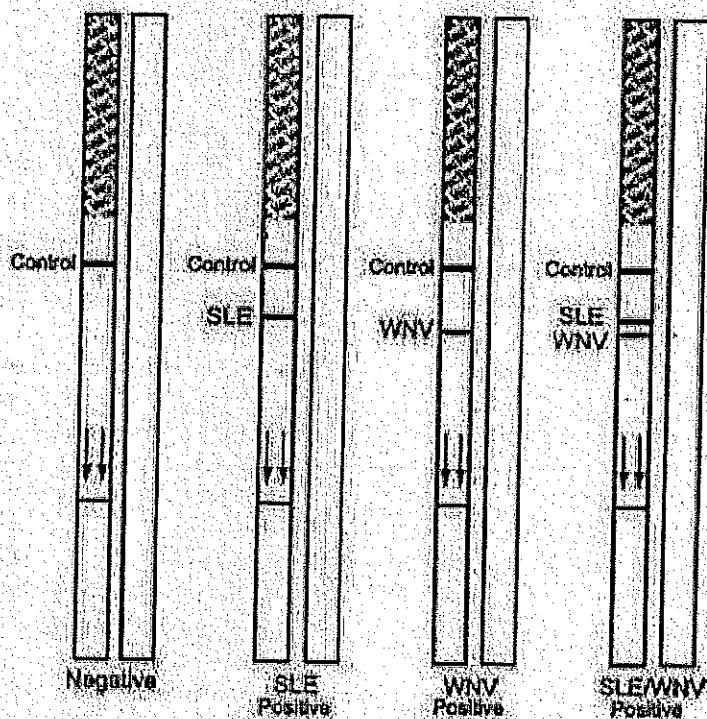


Fig. 3. Interpretación del resultado de la prueba inmunológica VecTest (Microgenics Corporation) donde se muestra el resultado negativo, control y detección del VON (WNV) y del virus de encefalitis de San Luis (SLE). La presencia solo de la línea de control indica un resultado negativo (1er tira a la izquierda). La presencia de dos o tres líneas indica la presencia de uno o ambos virus.

IV.4. EXTRACCION DE ARN VIRAL

Se utilizó el kit QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen®), y se siguió el protocolo de la casa comercial. Se utilizaron 140 µL del sobrenadante del homogeneizado de moscos previamente utilizado en la prueba VecTest y que estaba guardado a -70 °C. (Apéndice II).

IV.5. REVERSO TRANSCRIPCIÓN DE ARN VIRAL

La síntesis de DNAc viral se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit comercial REVERSE TRANSCRIPTION SYSTEM (PROMEGA®). Para esta reacción se utilizaron los cebadores al azar proveídos en el kit y los cebadores específicos de Lanciotti *et al.* (2000). La reverso transcripción fue efectuada a 42 °C para la primera reacción y a 50 °C para la segunda.

Los cebadores específicos de Lanciotti *et al.* (2000) fueron: WNV3F: 5' TTG TGT TGG CTC TCT TGG CGT TCT T 3' y WNV4R: 5' CAG CCG ACA GCA CTG GAC ATT CAT A 3', el tamaño del fragmento de DNA es de 408 pb. (Apéndice III).

IV.6. DETECCION DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO POR PCR ANIDADA

Se utilizó la mezcla de PCR 2X (PROMEGA®) y los cebadores específicos del VON, previamente elaborados por Shi *et al.* (2001). La mezcla se preparó con 7 µL de agua libre de DNAsas, 15 µL de mezcla 2X, 6 µL de DNAc obtenido previamente, 1 µL de cebador sentido F5 (25 pmol/µL): 5' CAG TGC TGG ATC GAT GGA G AGG 3', 1 µL cebador antisentido R6 (25 pmol/µL): 5' CCG CCG ATT GAT AG CAC T GGT 3', en un volumen total de 30 µL. La programación

del termociclador (LABNET, modelo: TC020-24) fue de: un ciclo de 3 min a 94°C, 40 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 56°C, y un min a 72°C, mas un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C. El control positivo para el PCR anidado fue sintético y se envió a sintetizar a la compañía Allele Biotech, Estados Unidos de América. Este se obtuvo a partir de la secuencia del genoma del VON de la cepa NY99 con registro No. EU249803 del banco de genes (NCBI) de la posición 287 a 390 (fragmento de 104 pb) como se muestra a continuación:

5' -cag tgc tgg atc gat gga gag gtg tga aca aac aaa cag cga tga aac acc ttc tga gtt tta aga agg aac tag gga cct tga cca gtg cta tca atc ggc gg- 3'.

Posteriormente se realizó una electroforesis de poliacrilamida al 6% para visualizar los productos de PCR obtenidos (Ausbel et al., 2002) (Apéndice IV).

IV.7. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DEL VON PRESENTE EN ENSENADA.

Uno de los genes empleados en la determinación del genotipo del VON es el gen NS5, por ello se obtuvieron cebadores de este gen, alineando las secuencias de los genomas de los dos linajes del VON, obtenidos del banco de genes NCBI (linaje 1: No. DQ211652, linaje 2: No. M12294) con los programas CLUSTALX y GENEDOC. Se obtuvieron secuencias conservadas en el 3' para ambos cebadores, teniendo variabilidad de bases en la región interna del fragmento que se amplificaría, para poder diferenciar ambos genotipos. Ambos cebadores no mostraron tener complementariedad analizada en el programa FASTPCR. Los cebadores diseñados mostraron tener el 100% de similitud con el VON en el Banco de genes (NCBI, BLAST).

Se realizó un RT-PCR para determinar el genotipo del VON igual que en el punto IV.5. se utilizaron los cebadores; sentido NS5F (1381-1390): GTG GCC ATT TTT GTC CAT GG, antisentido NS5R (1513-1532): TCC ACT GTC ACC TCT CCA TA. Tamaño del fragmento esperado: 152 pb.

IV.8. PROTOCOLO DEL KIT QIAQUICK (QIAGEN®) PARA PURIFICAR EL PRODUCTO DE PCR DEL GEL DE AGAROSA.

Se llevó a cabo de acuerdo a la casa comercial una vez hecha la electroforesis de ADN en agarosa (Apéndice V).

IV.9. CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR, AMPLIFICADO CON LOS CEBADORES NS5

Se utilizó el plásmido; pGEM®-T Easy Vectors (PROMEGA®) y se realizó de acuerdo a la casa comercial (Apéndice VI).

IV.10. TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS COMPETENTES DE E.coli, (cepa DH5α) Y SELECCIÓN DE CLONAS POSITIVAS.

Se utilizaron 50 µL de células competentes, a estas se les añadió 1 µL del ADN plasmídico, permaneciendo en hielo por 30 min. Posteriormente se colocó el tubo en un incubador en seco a 42°C por 90 seg después se regresaron al hielo. Se adicionó 800 µL de caldo LB y se incubó por 45 min a 37°C con agitación. Se transfirieron 100 µL a una caja de petri con agar LB-ampicilina (50 µg/ml) y se incubó 18 horas a 37°C. Se seleccionaron las clonas positivas resistentes a ampicilina (Ausbel *et al.*, 2002). Se corroboró que el plásmido tuviera el inserto mediante un PCR y los cebadores NS5, una vez seleccionada

la clona positiva se procedió a crecer la clona de nuevo con LB+ ampicilina por 18-24 hrs a 37 °C, después se purificó el ADN del plasmido con el Kit Qiaprep Spin Miniprep (QIAGEN®). Una vez obtenido el ADN plasmidico se procedió a enviar a secuenciar a la Universidad de San Diego (EUA).

IV.11. DETECCIÓN DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO (VON) POR EL MÉTODO DE ELISA.

Mediante este método se llevaron a cabo detecciones de anticuerpos IgM-antiVON de muestras sericas del Banco de sangre del Hospital General de la Ciudad de Ensenada, B.C. Las muestras pertenecían a pacientes que donaron sangre durante el periodo de primavera-verano del 2009. De estas muestras, se realizó una selección utilizando solo aquellas que presentaron cuentas de leucocitos menores al valor normal (menos de 5000 por mm³) por ser indicativo de infección viral. La identificación numérica de cada muestra fue de acuerdo a como estaban en su registro original del banco de sangre y una numeración arábica consecutiva.

Para la detección se utilizó el reactivo: West Nile Virus IgM capture DxSelect, ELISA (Focus Diagnostics®). Se realizó la metodología de acuerdo a la casa comercial (Apéndice I).

V. RESULTADOS

V.1. ANÁLISIS DE MOSQUITOS:

Se obtuvieron mosquitos de cinco estaciones de muestreo durante la primavera y verano de 2009 y primavera de 2010. De estas muestras resultó positiva la estación de muestreo localizada en el campo de Golf, Baja Country Club, situado al sur de la Ciudad de Ensenada (Tabla IV). El análisis de identificación taxonómica mostró que la especie predominante era *Culex pippiens* (99%), aunque se encontraron individuos de las especies: *Anopheles punctipennis*, *Posophora ciliata*, *Anopheles franciscanus*, y *Ochlerotatus niphadopsis*.

Las muestras positivas (Tabla IV, muestras 1, 5-8) detectadas con el kit VecTest fueron confirmadas por RT-PCR, para ello se obtuvo RNA viral del conjunto de muestras, con una concentración de 1.12 µg/µL. Se utilizaron 5 µg para la síntesis de ADNc. Posteriormente a la síntesis de ADNc se prosiguió a confirmar la presencia del VON mediante un PCR anidado, dando como resultado positivo la banda del tamaño empírico esperado de 104 pb, como se aprecia en la Figura 4.

Tabla IV. Resultados de detección del VON en mosquitos por la técnica de VecTest.

No. muestra	Fecha de Recolección	Estación de Muestreo	No. de Mosquitos	Positivo	Negativo
1	24,25/Ago/09	Campo de Golf, Baja Country Club	18	x	
2	16/Jul/20/Ago/09	Playa Municipal	20		x
3	10/Ago/09	Campo de Golf, Baja Country Club	18		x
4	25/Jul/09	Cañón de Doña Petra	30		x
5	18/Jul/09	Campo de Golf, Baja Country Club	18	x	
6	4, 5/Jul/09	Campo de Golf, Baja Country Club	24	x	
7	13/Jun/09	Campo de Golf, Baja Country Club	24	x	
8	13/Jun/09	Campo de Golf, Baja Country Club	19	x	
9	16/Jul/09	Playa Municipal	19		x
10	09/May/16/Jun/09	Cañón de Doña Petra	23		x
11	17/Mar/09	Presa Emilio López Zamora	19		x
12	16, 20/May/10	Presa Emilio López Zamora	20		x
13	30/May/10	Cañón de Dona Petra	30		x
14	17, 18/Jun/10	UABC campus el Sauzal	17		x

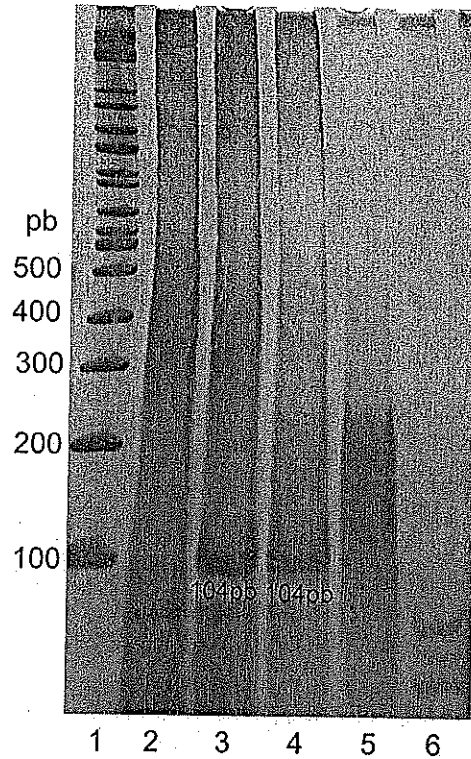


Fig. 4. Gel de Poliacrilamida (6%) que muestra el resultado de PCR anidado. carril 1) estándar de ADN, carril 2) resultado negativo utilizando el ADNc de Lanciotti et al. (2000) a 42°C, carril 3) resultado positivo utilizando el ADNc de Lanciotti et al. (2000) a 50°C, carril 4) control positivo sintético, carril 5) control negativo con ADN de mosquito, carril 6) control negativo, solo cebadores y mezcla de PCR.

Para determinar cual genotipo de VON se encuentra en Ensenada, Baja California se amplificó un fragmento del genoma del VON con los cebadores NS5 y se obtuvo el fragmento del tamaño esperado de 152 pb como se aprecia en el gel de poliacrilamida al 6% (Fig. 5).

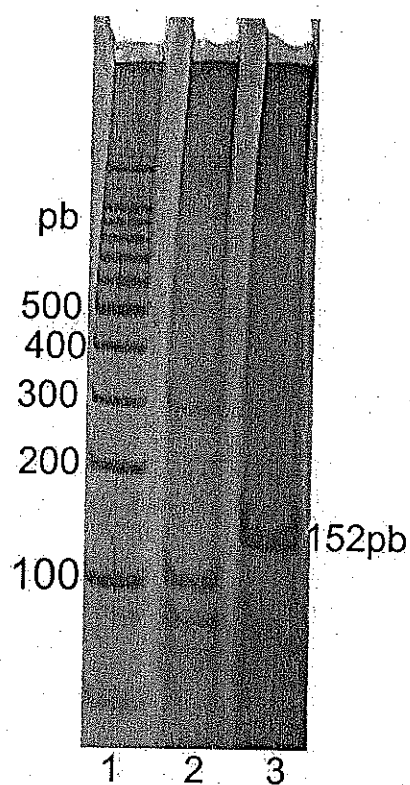


Fig. 5. Gel de Poliacrilamida al 6% que muestra el resultado de PCR para subsecuente identificación del linaje del VON. Carriles: 1) Estándar de ADN, 2) resultado negativo utilizando ADNc sintetizado con cebadores al azar, 3) resultado positivo con ADNc sintetizado con cebadores específicos (NS5).

La secuencia del producto de PCR obtenido con los cebadores específicos NS5, clonado y secuenciado dio el siguiente resultado:

5'-GAA TTC GAT TTC CAC TGT CAC CTC TCC ATA CTT GTT CGC TAT
CGG TCT CGT GGT GAT ATT TAG CTT TAG AAG GAG TTT ACC TCC CAC
TTT GTG CTG CAC TAT CAA GCA ACA CGA CTC CAT GGA CAA AAA TGG
CCA CAA TCA CTA GTG AAT-3'

Esta secuencia tiene un porcentaje de similitud en el banco de genes (NCBI) con los siguientes mosquitos: *Aedes aegypti* (97%), *Ochlerotatus nipponicus* (94%), *Ochlerotatus japonicus* (94%), entre otros y no con el VON.

V.2. ANÁLISIS EN SUERO SANGUÍNEO HUMANO:

De las 36 muestras de suero sanguíneo de humano analizadas procedentes del Banco de sangre del Hospital General de Ensenada, las cuales presentaban cuenta baja de leucocitos, mediante la técnica de ELISA. Todas ellas resultaron negativas como se puede apreciar en la Tabla V en la cual la línea de corte para ser positivo es de una absorbancia superior a 0.487. La lectura del blanco fue de 0.338, control negativo 0.328, control positivo 0.487 y calibrador 0.390.

Tabla V. Resultados de las absorbancias obtenidas en la técnica de ELISA anti-Von IgM de las muestras analizadas.

No muestra del Banco de sangre	No. arbitrario	Absorbancia	N = A-B	N/CAL	RESULTADO
10910	1	0.372	0.034	0.087	NEG
20410	2	0.367	0.029	0.074	NEG
11310	3	0.334	-0.004	-0.010	NEG
210107	4	0.371	0.033	0.085	NEG
10310	5	0.349	0.011	0.028	NEG
11010	6	0.359	0.021	0.054	NEG
12110	7	0.38	0.042	0.108	NEG
10610	8	0.49	0.152	0.390	NEG
10110	9	0.341	0.003	0.008	NEG
1610	10	0.343	0.005	0.013	NEG
20610	11	0.359	0.021	0.054	NEG
10710	12	0.352	0.014	0.036	NEG
280507	13	0.344	0.006	0.015	NEG
210709	14	0.339	0.001	0.003	NEG
300309	15	0.337	-0.001	-0.003	NEG
20110	16	0.348	0.01	0.026	NEG
301109	17	0.33	-0.008	-0.021	NEG
231007	18	0.346	0.008	0.021	NEG
12010	19	0.321	-0.017	-0.044	NEG
20710	20	0.333	-0.005	-0.013	NEG
10410	21	0.326	-0.012	-0.031	NEG
281007	22	0.353	0.015	0.038	NEG
11810	23	0.33	-0.008	-0.021	NEG
11510	24	0.326	-0.012	-0.031	NEG
10810	25	0.375	0.037	0.095	NEG
300609	26	0.341	0.003	0.008	NEG
240607	27	0.332	-0.006	-0.015	NEG
11710	28	0.328	-0.01	-0.026	NEG
230607	29	0.322	-0.016	-0.041	NEG
20210	30	0.333	-0.005	-0.013	NEG
241007	31	0.356	0.018	0.046	NEG
10510	32	0.336	-0.002	-0.005	NEG
210407	33	0.342	0.004	0.010	NEG
280410	34	0.332	-0.006	-0.015	NEG
11910	35	0.34	0.002	0.005	NEG
11410	36	0.35	0.012	0.031	NEG

(A = absorbancia, B = blanco; CAL = calibrador).

V.3. ANÁLISIS DE AVES:

Las aves recolectadas de diferentes áreas de la ciudad de Ensenada, todas ellas resultaron negativas al VON (Tabla VI).

Tabla VI. Resultado de la detección del VON en aves.

Nombre común. (Nombre científico)	Cantidad	Procedencia	Muestra	Resultado
Zanate (<i>Euphagus cyanocephalus</i>)	4	Manadero	Faringe	Negativo
Gaviota occidental (<i>Larus occidentalis</i>)	1	Presa Emilio López Zamora	Cerebro	Negativo
Pelicano café (<i>Pelecanus occidentalis</i>)	1	Punta Morro	Faringe	Negativo
Gorrión Ingles (<i>Passer domesticus</i>)	1	Cañón de Doña Petra	Cerebro	Negativo
Rascador de California (<i>Pipilo crissalis</i>)	1	Cañón de Doña Petra	Cerebro	Negativo
Gallina doméstica (<i>Gallus gallus</i>)	1	Cañón de Doña Petra	Cerebro	Negativo
Lechuza de campanario (<i>Tyto alba</i>)	1	Cañón de Doña Petra	Cerebro	Negativo
Gorrión Mexicano (<i>Carpodacus mexicanus</i>)	1	CICESE	Cerebro	Negativo

VI. DISCUSION

El presente estudio demuestra la presencia del VON en la ciudad de Ensenada Baja California México, mediante la detección de mosquitos infectados los cuales se localizaron en una de las estaciones de muestreo. Dicha estación es un club de golf ubicado al sur de la ciudad (campo de golf, Baja Country Club). Este hallazgo corrobora la evidencia positiva de que el VON se encuentra en la zona fronteriza de México con EUA. El haber encontrado el VON en *C. pipiens* confirma su competencia como vector, así como fue señalado por Turell *et al.* (2005), Goddard *et al.* (2002) y Nielsen *et al.* (2008), quienes demostraron experimentalmente que los mosquitos del género *Culex* se encuentra entre los vectores mas eficientes en la transmisión del VON. Bernard *et al.* (2001) y Turell *et al.* (2005) encontraron que, *C. pipiens*, *C. restuans* y *C. salinarius* fueron los mosquitos más predominantes durante el brote de Nueva York en 1999 y 2000. Asimismo, Kulasekera *et al.* (2001) encontraron otros vectores como: *Anopheles vexans*, *A. crucians*, *A. quadrimaculatus*, *Coquillettidia perturbans*, *Culex erraticus*, *C. territans*, *Ochlerotatus excrucians*, *O. intrudens*, *O. taeniorhynchus*, *O. triseriatus*, *O. trivittatus*, *Psophora ferox*, *P. columbiae* y *Uranotaenia sapphirina*. En Ensenada, Baja California, aunque se encontraron otras especies como; *O. punctipennis*, *P. ciliata*, *A. franciscanus*, *O. niphadopsis* y *O. purpuriens*, la especie *C. pipiens* fue la más abundante en las muestras positivas de VON. Cabe señalar que los mosquitos con VON positivo atrapados en el campo de golf presentaban contenido de sangre en su abdomen en especial los atrapados en la caseta de vigilancia, no obstante, no se

practicaron exámenes de sangre al personal de vigilancia para corroborar que fuese de ellos o de algún otro organismo. Por otro lado, el análisis de la presencia del VON en mosquitos fue realizado cinco meses después de la colecta así que el personal de vigilancia quizá para entonces ya se habría recuperado de haber presentado algún síntoma. Por lo tanto, esta estación de muestreo es de riesgo de infección para las aves, humanos y otros vertebrados. Se ha demostrado que las aéreas verdes contiguas a cuerpos de agua son el hábitat de preferencia de los mosquitos (Nielsen *et al.*, 2008; DeGrootte *et al.*, 2008; DiMenna *et al.*, 2007) y se hace notar que el campo de golf cuenta con estanques de agua y esta cubierto de pasto. En cuanto al clima se ha encontrado que el rango de temperatura que prefiere *C. pipiens* es de 14 a 30°C (Soverow *et al.*, 2009; Turell *et al.*, 2001) y el campo de golf Baja Country Club que fue positivo al VON, presentó una temperatura ambiental de los 14 a los 25°C durante el verano, por lo que se encontró dentro del intervalo óptimo de temperatura para su reproducción, pudiendo incrementar la posibilidad de transmisión del virus en humanos y otros organismos.

Bernard *et al.*, (2001) encontraron que *C. pipiens*, era el mosquito que presentaba la más alta tasa de infección por el VON en un estudio realizado en la ciudad de Nueva York en el año 2000, asimismo determinaron que el 67% de las aves muertas analizadas eran el cuervo americano (*Corvus brachyrhychos*).

Por otro lado, Hamer *et al.* (2009) investigaron si los mosquitos *C. pipiens* se alimentaban selectivamente de ciertas especies de aves, y si estas variaciones potenciales afectaban los patrones de transmisión del VON, encontrando que *C. pipiens* se alimentó de 25 especies de aves siendo el más frecuente el zorzal pechirojo (*Turdus migratorious*) en un 48%, el gorrión inglés (*Passer domesticus*) 15%, la paloma (*Zenaida macroura*) un 11% y el cardenal (*Cardinalis cardinalis*) 8%. Lo anterior se contradice a lo observado en el caso del brote de Nueva York en 1999, donde el cuervo americano (*C. brachyrhynchos*) fue el más afectado.

Aun cuando se detecto positividad del VON con el kit inmunológico de VecTest y RT-PCR, no se pudo determinar el genotipo de este virus en Ensenada, ya que los cebadores utilizados, amplificaron DNA genómico del mosquito, esto pudo deberse a que la muestra de ARN viral no fue tratada con DNAsas, ya que el Kit de extracción de ARN viral (Qiagen®) señalaba que era muy específico en la purificación de ARN viral y no fue así. Por otro lado en todos los estudios donde se ha obtenido la secuencia ya sea del gen NS5 o del genoma completo del VON, se lleva a cabo primero un cultivo celular en células Vero para obtener una gran concentración de ARN viral y poder secuenciar el DNAc y determinar el linaje (Charrel *et al.*, 2003; Eiden *et al.*, 2010), en este trabajo no se contó con las instalaciones necesarias en cuestión de bioseguridad (Laboratorio clase III) para poder realizar el cultivo viral y por lo tanto solo se trato con el ARN viral del conjunto de muestras. Cabe señalar que

la banda positiva en el VecTest era muy tenue de tal forma que nos indicaba la baja concentración del virus en las muestras positivas.

En cuanto a la detección del VON en aves en el presente estudio, sólo se analizaron diez, las cuales se recolectaron de diferentes lugares de la ciudad. Todas estas aves estaban muertas y en los casos de la gallina doméstica y el pelicano ya presentaban signos de descomposición, aún así se analizaron muestras de tejido encefálico y este se encontraba en buen estado. A pesar de que el estudio contempló la recolecta aves durante el año 2009 y primavera de 2010, la mayor parte de aves recolectadas fue en el presente año.

Cabe mencionar que se llevaron a cabo acciones para involucrar a la comunidad en la recolección de aves, se les invitó a través de medios de información como la Gaceta de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y gaceta de CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada). En dos ocasiones se participó en cabo dos programas de radio en una estación local de Ensenada, en la última divulgación se les dieron a conocer las instrucciones y medidas a realizar en caso de encontrar aves muertas. Asimismo se puso a disposición un número telefónico al cual podían llamar para reportar, al respecto solo se tuvo una llamada falsa.

Aunque este mecanismo ha dado resultados positivos en los Estados Unidos de América (California Department of Public Health, New York State Health Department) esto no sucedió en la ciudad de Ensenada.

Las especies de aves analizadas en este estudio, todas ellas se encuentran dentro de las especies reportadas en la literatura tanto nacional como internacional con positividad al VON (CENAVE 2003, Wheeler *et al.*, 2009; Ebel *et al.*, 2002), lo cual indica que aunque éstas fueron negativas, existe la posibilidad de que adquieran infección por VON. En la literatura la lista de aves reportadas positivas a VON es muy extensa y se ha encontrado que el cuervo americano es el más sensible a dicha infección, por lo que se le considera la especie centinela (Smedley *et al.*, 2007). Aún así durante el presente estudio no se encontró, ni se reportó algún cuervo. El ave que le sigue en sensibilidad es el gorrión domestico (*Passer domesticus*) (Komar *et al.*, 2003), del cual se analizó un individuo en este trabajo sin embargo, fue negativo. A ambas especies se les ha considerado como centinelas porque desarrollan viremias que exceden 10^{10} pfu ml⁻¹ (Komar *et al.*, 2003). El analizar aves muertas es una de las formas más importantes para la detección del VON, al igual que examinar muestras de órganos como, cerebro, corazón y riñones, los que han sido reportados como los tejidos que consistentemente se ha podido detectar y aislar el VON (Smedley *et al.*, 2007), por lo que concierne a la toma de muestras con cotonetes ya sea de fibra de algodón o de dacron se han reportado resultados positivos en muestras orales o cloacales obtenidas de aves con menos de 24 horas de muertas (Komar *et al.*, 2002).

Con respecto a los caballos no se analizó ninguno ya que para llevar a cabo el diagnóstico de VON, éstos debían de estar cursando la enfermedad o haber muerto. Tampoco hubo algún reporte de caballos muertos o enfermos por parte

del médico veterinario zootecnista Luis Arce, quien trabaja en el departamento de Epidemiología de la Secretaría de Salud en Ensenada. Asimismo se contactó al MVZ Daniel Luna Rubio quien es la persona encargada del VON en Tijuana, y esta a cargo del sub comité de vigilancia del VON en humanos del estado de Baja California, quién tampoco reportó ningún caso y comentó la ausencia de casos recientes. Sin embargo, en estudios previos en México, se detectaron caballos positivos con VON en el Noroeste del país en los estados de Tamaulipas, Coahuila, Chihuahua, Sonora, Nuevo León y Baja California en el año 2003 (Deardorff *et al.*, 2006; Fernández-Salas *et al.*, 2007; Medina-Basulto *et al.*, 2008). De igual forma debe mencionarse que en el vecino estado de California (EUA) se han presentado 1,133 casos positivos en caballos, desde el año 2003 a 2009 según el Departamento de Salud Pública de California (California Department of Public Health), lo cual presenta un escenario de notable prevalencia del VON, contrario a lo reportado para México.

Para el estudio de la presencia del VON en Humanos se analizaron 36 muestras de sangre con la técnica de ELISA para detectar anticuerpos anti VON-IgM, los cuales sólo se encuentran con títulos elevados (positivos) cuando se está cursando con la enfermedad. Todas las muestras analizadas en este estudio, provinieron del Banco de Sangre del Hospital General de Ensenada y de individuos donadores, cuya sangre presentaba una cuenta baja de leucocitos indicativo de patología viral, aun así todas las muestras fueron negativas.

La prueba de ELISA anti VON-IgM no es una prueba muy específica del VON, pues esta presenta reacción cruzada con otros retrovirus de la misma familia del VON, como son la encefalitis de San Luis y el Dengue, entre otras (Fernández-Salas *et al.*, 2007). Es por ello que de haber resultado alguna positiva requeriría la confirmación por RT-PCR, como se hizo en los mosquitos. En este punto se debe comentar que en nuestro país ya se ha investigado con esta misma técnica los casos positivos de VON, detectándose con la técnica de ELISA los anticuerpos anti VON-IgM y anti VON-IgG, este último se ve positivo cuando la persona cursó tiempo atrás una enfermedad por esta familia de retrovirus. Sánchez-Guerrero y colaboradores (2006), detectaron anticuerpos anti-VON IgG y anti-VON IgM, en un gran número de pacientes donadores en 29 estados de la Republica Mexicana entre los meses de Julio y Agosto de 2002 y 2004 y como resultado encontraron un solo caso positivo de anticuerpos anti VON-IgM en el estado de Chihuahua, además registraron un solo caso positivo de anticuerpos anti-VON IgG en la ciudad de México. Ambos anticuerpos positivos representaron el 0.03% de un total 3856 muestras analizadas a nivel nacional.

Igualmente en otros países Latino Americanos como Colombia se escogieron 52 muestras de sangre aleatorias de trabajadores dedicados a las labores de agricultura y cuyas edades fluctuaban entre 16 y 65 años; estas muestras se analizaron con la prueba de ELISA anti-VON IgG resultando positivas 38 (73%). Las personas de quienes se tomaron las muestras vivían en diferentes municipios del Departamento de Sucre, este departamento tiene una

temperatura anual promedio de 30°C y más de la tercera parte de su territorio es una depresión inundable, caracterizada por numerosas ciénagas donde anidan aves autóctonas y migratorias provenientes del hemisferio norte, características propicias para el desarrollo del vector y transmisión del VON (Mattar *et al.*, 2005). En Puerto Rico, Hunsperger *et al.* (2009) encontraron tres casos positivos de VON en humanos los cuales se detectaron por la Cruz Roja Americana (ARC) mediante el análisis de sangre de donadores, de estos, dos muestras se encontraron positivas mediante RT-PCR y una mediante inmunofluorescencia. Por otra parte, en el 2005 en Irán se estudiaron 500 muestras de sangre de donadores para determinar anticuerpos Anti-VON IgG y Anti-VON IgM mediante el método de ELISA habiendo encontrado 25 muestras positivas (5%) a IgG y todas las muestras negativas a anticuerpos IgM (Sharifi *et al.*, 2010).

Actualmente se ha estado analizando las nuevas epidemias y/o pandemias mundiales de diferentes microorganismos que estando confinados a una zona endémica, ahora se han diseminado por otras áreas geográficas (Sutherst, 2004). Esto se le ha atribuido al cambio climático y la gran disponibilidad de transporte comercial y/o turístico en el mundo (Sutherst., 2004; MacDonald, 2008). En el caso del VON se ha documentado que las aves migratorias, así como el turismo han contribuido a su dispersión, no obstante aun no se demuestra científicamente este suceso (Kilpatrick *et al.*, 2008; Soverow *et al.*, 2009).

La presencia de muestras de mosquitos *Culex pipiens* positivas al VON en la ciudad de Ensenada, B.C. indica que se deben de ampliar los monitoreos de este agente patógeno en la zona para preveer riesgos de infección en la población local.

VII. CONCLUSIONES

1. Se demostró la presencia del VON en la ciudad de Ensenada, Baja California, México.
2. Se diagnosticó por técnicas moleculares (RT, PCR anidada y ELISA) la positividad del VON únicamente en mosquitos. No se detectó el VON en aves, o humanos.
3. Los mosquitos positivos a VON fueron *Culex pipiens*.
4. Se corroboró por RT-PCR la presencia del VON en los mosquitos que fueron positivos por la prueba inmunológica VecTest.

VIII. RECOMENDACIONES

Llevar a cabo programas de control mediante fumigación de la zona comprobada con presencia de mosquitos positivos al VON y establecer un programa de detección y vigilancia epidemiológica en humanos, aves, caballos y otros vertebrados en la ciudad de Ensenada.

IX. LITERATURA CITADA

- Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. (2002). Short protocols in molecular biology, Fifth edition, John Wiley & Sons Inc.
- Beasley WC, Davis CT, Estrada-Franco J, Navarro-López R, Campomanes-Cortez A, Tesh RB, Weaver SC, and Barrett AT. Genome sequence and attenuating mutations in West Nile Virus isolate from Mexico, *Emerg Infect Dis.* 2004, 10(12): 221-224.
- Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kauffman EB, Ebel GD, Dupuis AP, Ngo KA, Nicholas DV, Young DM, Pei-Yong S, Kulasekera VL, Millicent E, White DJ, Stone WB, NY State West Nile Virus Surveillance Team, Kramer LD. West Nile Virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000, *Emerg Infect Dis.* 2001, 7(4): 679-685.
- Blitvich BJ, Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF, Marlenee NL, González-Rojas JI, Komar N, Gubler DJ, Calisher HC, and Beaty BJ. Serologic evidences of West Nile Virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2003, 9(7): 853-6.
- Blitvich BJ. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile Virus, *An Hlth Res Rev.* 2008, 9(1):71-86.
- Brown HE, Diuk-Wasser M, Fish D. Ecological factors associated with West Nile Virus transmission, Northern United States. *Emerg Infect Dis.* 2008. 4(10):1539-1545.

The California Department of Public Health, West Nile Virus Website, disponible en: <[http:// www.westnile.ca.gov/](http://www.westnile.ca.gov/)>.

Carpenter SJ, LaCasse WJ, 1974. Mosquitoes of North America (North of México). Berkeley (CA) University of California Press, 1955.

CENAVE (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica). Comité Intersectorial, guía para la vigilancia, prevención y control del virus Occidental del Nilo. Agosto 2003, disponible en: <<http://www.cenave.gob.mx/von/archivos/>>.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Virology: classification of West Nile Virus. 2003, disponible en: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/virus.html>>.

Corrigan RL, Waldner C, Epp T, Wright J, Whitehead SM, Bangura H, Young E, Townsend HG. Prediction of human cases of West Nile virus by equine cases, Saskatchewan, Canada, 2003. *Prev Vet Med.* 2006, 76 (34): 273-72.

Charrel RN, Brault AC, Gallian P, Lemasson JJ, Muregue B, Murri S, Pastorino B, Zeller H, de Chesse R, de Micco P, de Lamballerie X. Evolutionary relationship between old world West Nile Virus strains evidence for viral gen flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virol.* 2003, 315(2): 381-388.

Darsie RF Jr y Ward RA. Identification and Geographical Distribution of Mosquitoes of North America, North of Mexico, 2da edition, University Press. Florida, USA, 2004.

- Davis LE, De Biasi R, Goade DE, Haaland JH, Harrington JB, Harnar SA, Pergam SA, King MK, De Masters BK, and Tyler KL . West Nile virus neuroinvasive disease. *Ann Neurol*. 2006, 60 (3): 286-300.
- Deardorff E, Estrada-Franco JG, Brault AC, Campomanes-Cortés A, Paz-Ramírez P, Solís-Hernández M, Ramey WN, Davis CT, Beasley DW, Tesh RB, Barrett AT, and Weaver SC. Introductions of West Nile Virus to México. *Emerg Infect Dis*. 2006, 2 (12): 314-318.
- DeGroot JP, Sugumaran R, Brend SM, Tucker BJ, and Bartholomay LC. Landscape, demographic, entomological, and climatic associations with human, disease incidence of West Nile virus in the state of Iowa, USA. *Int J Health Geog*. 2008, 7(19) 1-16.
- DiMenna MA, Bueno R Jr, Parmenter RR, Norris DE, Sheyka JM, Molina JL, LaBeau EM, Hatton ES, Roberts CM, and Glass GE. Urban habitat evaluation for West Nile Virus surveillance in mosquitoes in Albuquerque, New Mexico, *J Am Mosq Ctrol Assoc*. 2007, 23(2): 153-160.
- DiMenna MA, Bueno R Jr., Parmenter RR, Norris DE, Sheyka JM, Molina JL, LaBeau EM, Hatton ES, and Glass GE. Emergence of West Nile Virus in mosquito (Diptera: Culicidae) communities of the New Mexico Rio Grande Valley. *J Med Entomol*. 2006, 43(3): 594-599.
- Ebel GD, Carricaburu J, Young D, Bernard KA, and Kramer LD. Phenotypic Variation of West Nile Virus in New York, 2000-2003, *Am J Trop Med Hyg*. 2004, 71(4): 493-500.

- Ebel GD, Dupuis AP, Nicholas D, Young D, Maffei J, and Kramer LD. Detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to West Nile virus in birds. *Emerg Infect Dis.* 2002, 8(9): 979-982.
- Eiden M, Vina-Rodriguez A, Hoffmann B, Ziegler U and Groschup MH. Two new real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineales 1 y 2 west nile virus Straits. *J Vet Diagn Invest.* 2010, 22 (5): 748-53.
- Elizondo-Quiroga D, Davis CT, Fernández-Salas I, Escobar-López R, Velazco-Olmos D, Soto-Gastelum LC, Aviles-Acosta M, Elizondo-Quiroga A, González-Rojas JC, Contreras-Cordero JF, Guzmán H, Travassos-daRosa A, Blitvich BJ, Barrett AT, Beaty JB, and Tesh RB. West Nile Virus isolation in human and mosquitoes, México, *Emerg Infect Dis.* 2005, 11(9): 1449-1452.
- Fernández-Salas I., Garza-Rodríguez ML, Beaty BJ, Ramos-Jiménez J, Rivas-Estilla AM. Presencia d el virus del oeste del Nilo en el Noroeste de México. *Salud Pub Méx.* 2007, 49 (3): 210-217.
- Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, and Scott TW. Vector competence of California mosquitoes for West Nile Virus. *Emerg Infect Dis.* 2002, 8 (12): 1385-1391.
- Granwehr BP, Lillibridge KM, Higgs S, Mason PW, Aronson JF, Campbell GA. West Nile virus: where are we now?. *Lancet Infect Dis.* 2004, 4: 547-56.

- Hamer GL, Kitron UD, Golbert TL, Brown JF, Loss SR, Ruíz MD, Hayes DB, and Walker ED. Host selection by *Culex pipiens* mosquitoes and West Nile Virus amplification. *Am Trop Med Hyg.* 2009, 80 (2): 268-278.
- Hunsperger EA, McElroy KL, Bessoff K, Candimar C, Barrera R, Muñoz-Jordán JL. West Nile Virus from Blood Donors, Vertebrates, and Mosquitoes, Puerto Rico, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2009, 15(8): 1298-1300.
- Komar N, Lanciotti R, Bowen R, Langevin S, and Bunning MB. Detection of West Nile Virus in oral and cloacal swabs collected from bird carcasses. *Emerg Infect Dis.* 2002, 8(7): 741-742.
- Kilpatrick AM, Meola MA, Moudy RM, Kramer LA. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile Virus by *Culex pipiens* mosquitoes, *PLoS Pathog.* 2008, 4(6): 1-7.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, and Bunning M. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile Virus. *Emerg Infect Dis.* 2003, 9(3): 311-322.
- Kulasekera VL, Kramer L, Nasci RS, Mostashari F, Cherry B, Trock SC, Glaser C, and Miller JR. West Nile Virus Infection in Mosquitoes, Birds, Horses and Humans, Staten Island, New York, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2000, 7(4): 722-725.
- Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, Roman N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, and Roehrig JT. 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.

Loroño-Pino MA, Blitvich BJ, Farfán-Ale JD, Puerto JI, Blanco JM, Marlenee NL, Rosado-Paredes EP, García-Rejón JE, Gluber DJ, Calisher CH, and Beaty BJ. Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Horses, Yucatán State, México, *Emerg Infect Dis.* 2003, 9 (7): 857-859.

Mattar S, Parra M, Torres J, Limitaciones para el serodiagnóstico del virus del oeste del Nilo en zonas endémicas con co-circulación de Flavivirus en el Caribe Colombiano, *Colombia Med.* 2005, 36 (3): 179-185.

Medina-Basulto GE, Sandoval EA, Rentería TB, López G, De la Mora A, Pujol LC, West Nile Virus detection by RT-PCR from mosquitoes in a locality of Baja California, México. *Rev Lat Microbiol.* 2008, 50 (3-4): 83-86.

MacDonald NE. West Nile virus in the context of climate change. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2008, 19 (3): 217-218.

Molaei G, Andrealis TG, Amstrong PM, Bueno R Jr., Dennett JA, Real SV, Sargent C, Bala A, Randle E, Guzman H, Travassos-da Rosa A, Wuithiranyagool, and Tesh RB. Host Feeding Pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera Culicidae) and Its Role in Transmission of West Nile Virus in Harris County, Texas. *Am J Trop Med Hyg.* 2007, 77(1): 73-81.

New York State Health Department, West Nile Virus and WNV hotline, disponible en: <<http://www.health.state.ny.us/home>> y <http://www.nyhealth.gov/press/releases/2002/deadbirdhotline>>

- Nielsen CF, Armijos NV, Wheeler S, Carpenter TE, Boyce WM, Kelley K, Brown D, Scott TW. Risk Factors Associates with Human Infection during the 2006 West Nile Virus Outbreak in Davis, a Residential Community in Northern California. *Am j Trop Med Hyg.* 2008, 78(1): 53-62.
- Ramos C. Falcón-Lezama A. La fiebre del Nilo Occidental: Una enfermedad emergente en México. *Salud Púb Méx.* 2004, 46(5):488-90.
- Rappole JH, and Hubalek Z. Migratory birds and West Nile Virus. *J Appl. Microbiol.* 2003, 94 (Suppl): 47 S- 58 S.
- Richards SL, Mores CN, Lord CC, Tabachnik WS. Impact of Extrinsic Incubation Temperature and Virus Exposure on Vector Competence of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) for West Nile Virus. *Vec Bor Zoon Dis.* 2007, 7(4): 629-636.
- Salazar P, Traubs-Dargastz JL, Morley PS, Wilmot DD, Steffen DJ, Cunningham WE, Salman MD. Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors Associated with death. *J Am Vet Med Assoc.* 2004, 225 (2): 267-74.
- Shi P-Y, Kauffman EB, Ren P, Felton A, Tai JH, Dupuis II AP, Jones SA, Ngo KA, Nicholas DC, Maffei J, Ebel GD, Bernard KA, and Kramer LD. High-Throughput Detection of West Nile Virus RNA. *J Clin Microbiol.* 2001, 39(4): 1264-1271.
- Smedley RC, Patterson JS, Miller RS, Massey JP, Wise AG, Maes RK, Ping Wu, Kanneene JB, and Kiupel M. Sensitivity and specificity of monoclonal and polyclonal Immuno histochemical staining for West Nile

- virus in various organs from american crows (*Corvus brachyrhynchos*),
BMC Inf Dis J. 2007, 7(49): 1-9.
- Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, JH Paul. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. AMJ. Trop. Med. 1940, 20: 471-492.
- Sutherst RW. Global Change and Human Vulnerability to Vector-Borne Diseases. Clin. Microbiol. Rev. 2004, 17(1): 136–173.
- Sánchez-Guerrero SA, Romero-Estrella S, Rodríguez- Ruíz A, Infante-Ramírez L, Gómez A, Villanueva-Vidales E, García-Torrez M, Domínguez AM, Vázquez JA, Calderon ED, Valiente-Banuet L, Linnen JM, Broulik A, Harel W, and Marin y López RA. Detection of West Nile virus in the Mexican blood supply. Trans. 2006, 46(1): 111-117.
- Sharifi Z, Mahmoodian-Shooshtari M, Talebian A. A Study of West Nile Virus Infection in Iranian Blood Donors, Arch Iran Med. 2010, 13(1): 1-4.
- Sejvar JJ. The long-term outcomes of human West Nile virus infection. Clin Infect Dis. 2007, 44 (12): 1617-1624.
- Sejvar JJ and Marfin AA. Manifestations of West Nile neuroinvasive disease. Rev Med Virol. 2006, 16 (4): 209-224.
- Soverow JE, Wellenius GA, Fisman DN, and Mittleman MA. Infectious disease in a Warming World: How Weather Influenced West Nile Virus in The United States (2001-2005). Env Health Persp. 2009, 117(7): 1049-1052.

- Styer LM, Kent KA, Albright RG, Bennett CG, Kramer LD, Bernard KA. Mosquitoes Inoculate High Doses of West Nile Virus as They Probe and Feed on live Host. PLoS Pathog. 2007, 3(9): 1262-1270.
- Trevejo RT and Millicent E. West Nile Virus. JAVMA. 2008, 9 (232): 1302-1309.
- Turell MJ, Sardelis MR, Dohm DJ, and O'Guinn ML. Potential North American Vectors of West Nile Virus. Ann NY Acad Sci. 2001, 317-24.
- Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, O'GuinnML, Andreadis TG, and Blow JA. An Update on the Potential of North American Mosquitoes (Diftera culicidae) to Transmit West Nile Virus, J Med Entomol. 2005, 42(1): 57-62.
- Wheeler SS, Christopher BM, Y Fang, Armijos MV, Carroll BD, Husted S, Johnson WO, and Reisen WK. Differential Impact of West Nile Virus on California Birds. Condor. 2009, 111(1): 1-20.
- Xiao S-Y, Guzman H, Zhang H, Travassos Da Rosa A and Tesh RB. West Nile Virus in golden hamster (*Mesocricetus auratus*): A model for West Nile encephalitis. Emerg Infect Dis. 2001, 7(47): 714-721

X. APÉNDICES

Apéndice I. MÉTODO INMUNOLÓGICO DE ELISA: (FOCUS Diagnostics®)

- 1- Se hidrató el antígeno con 8 ml del diluyente de muestras.
- 2- Las muestras, calibrador y controles se diluyeron: 1:1000, para ello se colocó 10 μ L de la muestra (control y calibrador) y 990 μ L de diluyente de muestras.

Procedimiento:

- 1- Se hidrataron los positos con 250 μ L del amortiguador de lavado 1x.
- 2- Luego se desechó el amortiguador de lavado, colocando los positos boca abajo y golpeándolos sobre un papel secante.
- 3- Enseguida se depositaron 100 μ L de cada muestra, estándares y controles en positos independientes.
- 4- Se taparon los positos con papel adhesivo y se incubaron por 60 ± 1 minuto a temperatura ambiente (20 a 25°C).
- 5- Posteriormente se lavaron tres veces los positos con amortiguador de lavado, y en el último lavado se decantó y removió el remanente sobre papel secante.
- 6- Enseguida se colocaron 100 μ L del antígeno en cada posito.
- 7- Luego se lavaron por tres veces, igual que el paso 5.
- 8- Se añadieron 100 μ L de antígeno en cada posito y se taparon con papel adhesivo y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente.
- 9- Después se lavó igual que en el paso 5.

10- Se añadieron 100 μ L de conjugado y se taparon con papel adhesivo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.

11- Se lavaron de nuevo como el paso 5.

12- Posteriormente se añadieron 100 μ L del sustrato y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.

13- La reacción se detuvo añadiendo 100 μ L de solución de Parado.

14- Se cuantificó en un espectrofotómetro a 450 nm ajustando a cero con un pozo vacío.

CALCULOS:

1. Cálculo para el Índice de los Controles:

Índice para controles (calibrador e índice de control) = $DO \text{ "Ag"}/ DO$
calibrador. $DO \text{ Ag} =$ Densidad optica del antígeno

$DO \text{ calibrador} =$ Densidad optica del calibrador

2. Cálculo del Índice para las muestras de pacientes:

$DO \text{ Neta del Paciente} = DO \text{ muestra} - DO \text{ del Blanco}$

Índice para Muestra de Pacientes = $DO \text{ Neta de Pacientes}/ DO \text{ del calibrador.}$

3. Interpretación: Usando los rangos de la sección de interpretación

Ejemplo: Negativo < 0.09 , y positivo > 1.10

Apéndice II. EXTRACCION DE ARN VIRAL DE MOSQUITOS (QIAGEN®)

- 1- Se pipetearon 1120 μL de amortiguador AVL preparado con 11.2 μL del amortiguador con el transportador de ARN-AVE
- 2- Se agregó 280 μL del sobrenadante del homogeneizado de mosquitos y se mezcló mediante pulsos de vortex por 15 segundos.
- 3- Se Incubó a temperatura ambiente (15- 25°C) por 10 min.
- 4- Enseguida se centrifugó brevemente
- 5- Se Agregó 560 μL de etanol (96 a 100%) a la muestra y se mezcló mediante pulsos de vortex de 15 seg.
- 6- Cuidadosamente se aplicó 630 μL de etanol a la mini columna QIAamp sin humedecer el borde. Se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) por un min. Se Colocó la columna dentro de un tubo colector de 2 ml, y se vació el filtrado del contenido del tubo.
- 7- Se repitió el paso 6.
- 8- Cuidadosamente se agregaron 500 μL de amortiguador AW1. Después se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) por un min. Se colocó la columna en un tubo colector limpio de 2 ml, y se decantó el filtrado.
- 9- Para eluir el ARN, se colocó la columna en un tubo nuevo y se añadió 60 μL de amortiguador AVE. Se incubó por un minuto y se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) por un min.
- 10- La determinación de la concentración de RNA total se realizó por espectrofotometría a 260 nm.
- 11- $\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{Abs a } 260 \text{ nm} \times \text{Factor de dilución} \times 40 \mu\text{g RNA/ } 1\text{ml}$

Apéndice III. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (Promega®)

Se preparó una reacción de 50 μL mediante la adición de los siguientes reactivos:

Reactivos (concentración)	Cantidad
MgCl ₂ (25 Mm)	10 μL
Amortiguador (10X) de Reverso Transcripción	5 μL
Mezcla de dNTPs (10 mM, c/u)	5 μL
Inhibidor Recombinante de RNasin	1.25 μL
AMV Reverso Transcriptasa (25 U/ μL)	1.5 μL
Cebador* sentido WNV 3F (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2 μL
Cebador antisentido WNV 4R (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2 μL
ARN total (0.756 ng/ μL)	10 μL
Agua libre de nucleadas	13.25 μL
Volumen final	50 μL

* También se utilizaron cebadores al azar en otra reacción independiente.

Apéndice IV. PREPARACION Y TINCION DE UN GEL DE POLIACRILAMIDA 6% PARA LA VISUALIZACION DEL PRODUCTO DE PCR.

Se mezcló 1 mL de amortiguador TAE 10X (48.4 gr. TRIS BASE, 11.42 ml de Ac. Acético glacial, 20 ml de EDTA 0.5M, pH 8.0), 6.757 ml de agua destilada, 8 μ L TEMED y 100 μ L de Persulfato de amonio (10%). La electroforesis se realizó a 100 Volts por 1.30 hrs. posteriormente se tiñó como se describe a continuación:

Se colocó el gel en la solución A (5 ml de etanol, 250 μ L de Acido acético, 44.75 mL de agua destilada) y se agitó suavemente 4 min. Después se decantó la solución y se añadió agua destilada y se agitó suavemente 1 min, enseguida se decantó y se adicionó la solución B (25 mL de Nitrato de Plata al 1%, 20 ml de agua destilada), se dejó 10 min con agitación suave. Se desechó la solución y se lavó con agua destilada, enseguida se agregó la solución C (25 ml de hidróxido de sodio al 3%, 25 ml de formaldehído a 0.3%), se reveló en 6 min. Se decantó la solución y se colocó la Sol. D (5 ml de Carbonato de sodio al 7.5%, 45 ml con agua destilada).

Apéndice V. PROTOCOLO PARA PURIFICAR EL PRODUCTO DE PCR DEL GEL DE AGAROSA DE ACUERDO AL KIT QIAQUICK (QIAGEN®).

- 1- Cortar el fragmento de DNA del gel de agarosa con un bisturí limpio y con filo bajo luz uv.
- 2- Pesar el gel y agregar 3 volúmenes de buffer GC a un volumen de gel (100mg~ 100µL).
- 3- Incubar a 50°C por 10 min (o hasta que el gel se haya disuelto).
- 4- Agregar a un volumen de gel en un volumen de isopropanol y mezclar.
- 5- Colocar una columna QIAquick en un tubo de colección de 2 ml proveído por el Kit.
- 6- Aplicar la muestra a la columna y centrifugar por un minuto.
- 7- Desechar el líquido y colocar la columna de regreso en el mismo tubo de colección.
- 8- Agregar 0.5 ml de Buffer GQ a la columna y centrifugar por 1 min.
- 9- Para lavar, adicionar 0.75 ml de Buffer PE a la columna y centrifugar por un minuto.
- 10- Desechar el líquido y centrifugar la columna por un minuto adicional.
- 11- Colocar la columna dentro de un tubo para micro centrifuga limpio de 1.5 ml. Para eluir el DNA, añadir 50 µL de Buffer EB en el centro de la membrana de la columna y centrifugarla por 1 min.

Apéndice VI. CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR, AMPLIFICADO CON LOS CEBADORES NS5 (pGEM[®]-T and pGEM[®]- T Easy Vector System).

La reacción se realizó como se describe a continuación, mezclando los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad
Buffer 2X de Ligación	5 μ L
pGem [®] -T y pGEM [®] -T Easy Vectors (5ng)	1 μ L
Producto de PCR	3 μ L
T4 DNA Ligasa (3 U/ μ L)	1 μ L
Agua Desionizada	0 μ L
Volumen final	10 μ L

Se incubo la reacción toda la noche a 4°C.

ANEXO

Procedimiento metodológico

