



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACTORES DE RIESGO Y PREVALENCIA PARA
LA INFECCIÓN EN CABALLOS CON EL VIRUS
DEL OESTE DEL NILO EN EL MUNICIPIO DE
ALDAMA, TAMAULIPAS.

P R E S E N T A

JUDITH MARGARITA GAYMARD MOTE

TUTOR:

JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA

COMITÉ TUTORAL:

ELIZABETH MORALES SALINAS
FELICIANO MILIÁN SUAZO

MÉXICO D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A MI HIJO GAEL
POR SER
MI ALEGRIA DIARIA,
Y PARTE ESENCIAL DE MI VIDA

A MIS PADRES
PORQUE SU ESFUERZO SE VE REFLEJADO EN MIS LOGROS

A MIS HERMANOS Y CUÑADO
CON CARÍÑO

A MIS SOBRINOS ZAÚL Y ZARAH
POR ALEGRAR MI CORAZÓN EN MOMENTOS DIFÍCILES

A TODOS LOS AMIGOS QUE HIZE
DURANTE ESTE TIEMPO
POR EL APOYO SINCERO.

AGRADECIMIENTOS

Laboratorio de epizootiología del CENID – Microbiología del INIFAP

M en C Julieta Sandra Cuevas Romero
M. en C. Pedro Mejía Sánchez
MVZ Miguel Ángel Cámara Viana
MVZ Germán Colmenares Viladomat
MVZ Arturo García Fraustro
M en C. Arcelia Ramírez
M en C Dionisio Córdova López del INIFAP

Campo Experimental del INIFAP en Aldama:

Ing. Miguel Ángel González Patrón
Ing. Enrique Valenzuela
Sr. Pablo Barrón Montalvo

Comisión México Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales (CPA):

Dr. Pedro Paz Ramírez
M en C Carmen Castro Méndez
MVZ Mario Solís Hernández
MVZ Francisco Liljehult
MVZ Marco Antonio Rico Gaytán
M en C Lourdes Guerrero López
pMVZ Mónica y Jesús
MVZ Luis Fernando Liera Gutiérrez
MVZ Rodolfo de Leija

MVZ Jesús Medellín Ledezma de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.

A todo mi jurado.

Esta tesis fue parcialmente financiada por el proyecto
CONACyT – SAGARPA 2003 – 025.

De corazón muchas gracias porque cada aportación sirvió para fortalecer este trabajo.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de anticuerpos e identificar factores de riesgo sobre la posible existencia del VON en caballos de tres municipios de Tamaulipas durante la temporada de lluvias del año 2006. Para esto se obtuvo suero de 300 caballos en 45 unidades de producción y se colectó información sobre posibles factores de riesgo. Para el diagnóstico serológico se utilizaron las técnicas de ELISA y PRNT. Se analizó la concordancia entre las técnicas, se determinó la prevalencia en el tamaño mínimo de muestra y se analizaron los factores de riesgo mediante la razón de probabilidades, chi-cuadrada y regresión logística. Como resultado se obtuvo una baja concordancia entre las técnicas empleadas, la prevalencia fue de 30%, en el análisis univariado resultaron relevantes las variables: altitud, ausencia de depósitos naturales de agua y la función zootécnica, aunque mediante la regresión logística la única variable que se encontró significativa fue altitud ($p < 0.01$). La prevalencia de anticuerpos encontrada es similar a la notificada en otros estudios, en donde además se ha visto que el tipo de vegetación, la presencia de depósitos artificiales de agua, la presencia de aves silvestres y de mosquitos están relacionados directamente con la transmisión y permanencia del virus en el ambiente. La positividad encontrada indica que los caballos en la zona de estudio han estado expuestos al virus, sin embargo no es posible deducir si se encontraban infectados durante el muestreo.

Palabras clave: Virus del Oeste del Nilo, ELISA, PRNT, factores de riesgo, prevalencia.

ABSTRACT

The present study had as objective to determine the prevalence of antibodies and to identify risk factors that condition the possible existence of the West Nile Virus in horses of three counties of Tamaulipas during the season of rains of year 2006. For this, serum samples of 300 horses in 45 production units was obtained and questionnaire information about possible risk factors was collected. For the serological diagnostic were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and plaque reduction neutralization test (PRNT). The concordance between the techniques was analyzed, the prevalence of antibodies was obtained and risk factors were assess by the odds ratio, chi square and logistic regression.

As result, a low concordance between the techniques was obtained, the prevalence of antibodies in the minimum size of sample was 30%. On the univariate analysis was significant the altitude, absence of natural water deposits and zootechnical function. By the logistic regression the only variable that was significant was the altitude ($P < 0.01$). The prevalence of antibodies found is similar to the ranks in other studies. Is known by other studies that the vegetation, the presence of artificial water deposits, the presence of wild birds and mosquitoes are related directly to the transmission and permanence of the virus in the environment. The horses in the study zone have been exposed to the virus, however deducing if they were become infected during the sampling is not possible.

Key words : West Nile Virus; risk factors; enzyme-linked immunosorbent assay; plaque reduction neutralization test; prevalence.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	
Características generales del virus _____	1
Antecedentes y distribución del VON _____	2
Ciclo de transmisión _____	3
Vectores _____	4
Reservorios _____	5
Especies afectadas _____	6
Diagnóstico diferencial _____	6
Técnicas de diagnóstico _____	7
Indicadores de Riesgo _____	7
Situación del VON en México _____	8
Medidas de Prevención _____	9
2. JUSTIFICACIÓN _____	11
3. OBJETIVOS	
Objetivo general _____	12
Objetivos específicos _____	12
4. HIPÓTESIS _____	12
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
Ubicación espacial y población _____	13
Obtención del TMM y tipo de muestreo _____	13
Diseño de cuestionario para la identificación de factores de riesgo _____	14
Obtención de muestras y levantamiento de cuestionarios _____	15
Diagnóstico serológico de muestras _____	15
- Determinación de anticuerpos IgG _____	15
- Determinación de anticuerpos IgM _____	16
- Técnica confirmatoria PRNT _____	16
- Diagnóstico diferencial _____	17
Análisis de datos _____	18
Ubicación geográfica de UP con animales seropositivos a VON _____	19
6. RESULTADOS	
Descripción de las UP _____	20
Diagnóstico de muestras _____	21
Análisis estadístico de variables _____	22
7. DISCUSIÓN _____	24
8. CONCLUSIONES _____	32
9. LITERATURA CITADA _____	33

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Frecuencia de muestras obtenidas por municipio para el diagnóstico del VON en Tamaulipas, México 2006 _____ 38
- Cuadro 2 Finalidad de 45 Unidades de Producción (UP) en tres municipios de Tamaulipas, México 2006 _____ 39
- Cuadro 3 Tipo de depósitos naturales y artificiales de agua en 45 UP de la zona de Aldama Tamaulipas, México 2006 _____ 40
- Cuadro 4 Resultado del diagnóstico serológico para VON por diferentes técnicas, de 300 sueros de caballo de la zona de Aldama, Tamaulipas, México 2006 _____ 41
- Cuadro 5 Concordancia entre las técnicas utilizadas para el diagnóstico serológico de Virus del Oeste del Nilo en 300 sueros de caballo de la zona de Aldama, Tamaulipas, México 2006 _____ 42
- Cuadro 6 Análisis estadístico para determinar el riesgo de las variables medidas en 300 caballos de la zona de Aldama, Tamaulipas, para diagnóstico de VON, México 2006 _____ 43
- Cuadro 7 Frecuencia de edad y diagnóstico serológico para VON por la técnica de PRNT de 300 caballos muestreados en la zona de Aldama, Tamaulipas, México 2006 _____ 44
- Cuadro 8 Unidades de producción (UP) positivas para VON y análisis para determinar el riesgo de infección en tres municipios de Tamaulipas, México 2006 _____ 45
- Cuadro 9 Análisis de variables basado en el total de individuos (n=300) muestreados para determinar el riesgo de infección para el VON en la zona de Aldama, Tamaulipas, México 2006 _____ 46
- Cuadro 10 Análisis de variables basado en el total de UP muestreadas (n=45) para determinar el riesgo de infección para el VON en la zona de Aldama, Tamaulipas en 2006 _____ 47
- Cuadro 11 Regresión logística de variables para determinar el riesgo de infección para el VON en la zona de Aldama, Tamaulipas, México 2006 ____ 48

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1 Mapa del área de estudio para la detección de anticuerpos contra el virus del oeste del Nilo _____ 49
- Anexo 2 Cuestionario para el muestreo serológico de caballos e identificación de factores de riesgo para el virus del oeste del Nilo _____ 50
- Anexo 3 Instructivo del cuestionario para el muestreo serológico de caballos e identificación de factores de riesgo para el virus del oeste del Nilo _____ 51
- Anexo 4 Procedimiento para la técnica de ELISA indirecto para el diagnóstico de virus del oeste del Nilo adaptada en un laboratorio con nivel 2 de bioseguridad _____ 52
- Anexo 5 esquema de la posición de sueros en la placa para la técnica de ELISA-I para diagnóstico de virus del oeste del Nilo en un laboratorio de nivel 2 _____ 53
- Anexo 6 Lista de reactivos para la técnica de ELISA – I para el diagnóstico de virus del oeste del Nilo en un laboratorio de nivel 2 _____ 54
- Anexo 7 Esquema de la posición de sueros en la placa para la técnica de ELISA-I para diagnóstico de virus del oeste del Nilo en un laboratorio de nivel 3 _____ 55
- Anexo 8 Distribución de las UP muestreadas para obtención de prevalencia e identificación de factores de riesgo para virus del oeste del Nilo _____ 56
- Anexo 9 Ubicación geográfica de UP con caballos positivos a la serología para virus del oeste del Nilo en relación a la altitud _____ 57

1. INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIRUS.

El Virus del Oeste del Nilo (VON) es miembro de la Familia Flaviviridae, del género Flavivirus y pertenece al grupo de los arbovirus, virus que se multiplican en artrópodos hematófagos (1,2).

Está compuesto básicamente por dos partes: una nucleocápside icosaédrica, que encierra en su interior una cadena simple de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva y la envoltura, la cual toma de la membrana celular. El virus se replica en el citoplasma en asociación muy estrecha con el retículo endoplásmico rugoso. El diámetro del virión va de 45 a 50 nm. El genoma del virus, de unos doce mil nucleótidos, consiste en una región no codificadora muy pequeña, un marco abierto de lectura que codifica una poliproteína, que al ser procesada da lugar a tres proteínas estructurales: C (por cápside), M (por membrana) y E (por envoltura) y siete no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) y finalmente otra región no codificadora grande. La glicoproteína E (53 kDa) es inmunológicamente la más importante, actúa como hemoaglutinina viral e interviene en la unión del virus con la célula que infecta (2, 3).

En cuanto a sus características fisicoquímicas, en virtud de los peplómeros glucoproteicos que se proyectan de su envoltura, el virus hemoaglutina bajo muy restringidas condiciones de pH y temperatura. Los eritrocitos de gansos, pichones y de pollos de un día de nacidos son los más sensibles. El virus es susceptible a la inactivación, tanto por el calor como por los solventes de lípidos. (1).

Se ha demostrado que la cápside del virus produce por sí misma condensación nuclear y muerte celular en cultivos. Además, a través de las mitocondrias induce apoptosis. En estudios experimentales, la inoculación intracerebral del virus produce necrosis en las células piramidales del hipocampo y con menor frecuencia en bulbos olfatorios, corteza cerebral y células granulares del cerebelo (4).

El virus es miembro del complejo de la Encefalitis Japonesa, junto con el virus de la encefalitis de San Luis, el de la fiebre del Valle de Murray y el de Kunjin. Todos los flavivirus están relacionados antigénicamente y puede haber reacciones cruzadas en pruebas de laboratorio, por lo que se requiere de técnicas especializadas para su identificación (2). Así mismo, el virus del Dengue tiene un alto espectro de antígenos y epitopos compartidos con el VON (5).

El virus se divide genéticamente en dos linajes: el linaje I corresponde a cepas que han sido aisladas de África, India, Europa, Asia, Medio Oriente y Norte América y que se asocian con casos de encefalitis humana y equina así como con mortalidad de aves. Las cepas del linaje II aparentemente se han mantenido de manera enzootica en África y no se han asociado a casos de encefalitis humana (2,6).

ANTECEDENTES Y DISTRIBUCIÓN DEL VON.

El virus fue aislado e identificado a partir de una mujer nativa del distrito Oeste del Nilo en Uganda en 1937 (2). El primer reporte en el que se describe una epidemia por VON fue hecha en Israel en 1951 (7). Pocos reportes de casos en equinos han sido publicados: en Egipto hubo una prevalencia de 54% durante una vigilancia serológica en caballos, burros y mulas en 1959. Sólo ocurrió un caso fatal, el cual fue confirmado por aislamiento viral. En Francia ocurrió un brote en 1962 y en Egipto otro en 1963 (7, 8). En Marruecos, 42 equinos murieron de 94 afectados en 1996. La enfermedad fue reportada en caballos de todas las edades. En Italia, durante 1998 fueron confirmados 14 caballos como positivos, 6 de los cuales murieron. Ese mismo año pero en Israel, 18 caballos con encefalomiелitis resultaron positivos serológicamente para VON, y en 1999, miles de gansos fueron sacrificados por identificarse el virus en naves comerciales. En Estados Unidos se detectaron 20 caballos infectados en 1999, de los cuales 9 murieron. En el 2000 fueron confirmados 63 casos equinos con aproximadamente 35% de letalidad. En Francia, durante el brote del 2000, se observó un porcentaje de mortalidad de 28% (7).

Hasta 1999 la dispersión del virus estaba limitada a África, Asia, Medio Oriente y Europa, pero en el verano de ese mismo año se presentó en Nueva York, Estados Unidos y a partir del primer caso, el virus se ha diseminado a otros lugares del continente (2,8).

El brote en Nueva York indica el movimiento del virus fuera de su distribución geográfica habitual, además de presentarse clínicamente en humanos, caballos y aves (6). Se desconoce cómo o cuándo el VON fue introducido a los E.U. Se han propuesto varias rutas de entrada, incluyendo migración, importación y comercio ilegal de aves, o la posibilidad de que mosquitos infectados hayan sido transportados por barco o avión (8,9). La relación genética que guarda el virus aislado en Israel y el virus aislado en Nueva York sugiere que el virus fue trasladado de Medio Oriente hacia Norte América (2).

En 2002 se encontraron resultados serológicos positivos en caballos, pollos y aves de corral en República Dominicana. En 2003, el VON se diseminó en México y parte norte de Centroamérica en El Salvador y Guatemala, así como en las Bahamas, Puerto Rico y Cuba. La primera evidencia serológica de actividad vírica en ecosistemas sudamericanos se detectó en 2004 en Colombia y Trinidad en animales domésticos (10). En América, el último caso oficial reportado en equinos fue en Argentina el 11 de mayo de 2006 (11).

CICLO DE TRANSMISIÓN.

El principal ciclo de transmisión del VON involucra a los mosquitos ornitofílicos como vectores y a las aves silvestres como reservorios (9). Los vectores potenciales son aquellos que se alimentan exclusivamente de aves pues éstas, dependiendo de la especie, desarrollan altos niveles de viremias con varios días de duración. De esta manera, los mosquitos transmiten el virus a otro huésped amplificador y el ciclo se completa (6, 12).

En un ciclo secundario, se involucran diferentes especies de artrópodos que se alimentan tanto de aves como de otra clase de vertebrados y transmiten el virus a huéspedes entre los que se encuentran mamíferos y reptiles (9,13).

VECTORES.

Durante el brote de 1999 en Nueva York, las especies de mosquitos en las que se identificó el virus fueron: *Culex* (*C. pipiens*, *restuans*, *salinarius*), *Aedes vexans*, *Ochlerotatus* (*j. japonicus*, *triseriatus*, *atropalpus*), *Anopheles* (*punctipennis*, *albopictus*), *Culiseta melanura* y *Psorophora ferox* (13).

La infección con el VON ha sido documentada en una gran variedad de especies de moscos, pero el género *Culex* es clave en el mantenimiento de los ciclos locales de transmisión (9).

En zonas templadas, durante los meses de invierno, el virus se mantiene en los mosquitos adultos durante su hibernación (8). Cuando un mosquito se alimenta de un huésped virémico, este ingiere el virus y si en su tracto digestivo están presentes los receptores apropiados, el proceso de infección inicia, de lo contrario es digerido y excretado sin producir infección. El virus debe replicarse y pasar al hemocele, una vez ahí, replicarse de nuevo en el cuerpo del mosquito hasta conseguir llegar a las glándulas salivales en las cuales vuelve a replicarse y posteriormente es secretado en la saliva al alimentarse de un huésped susceptible (13).

Los arbovirus han logrado sobrevivir durante los periodos de inactividad de los vectores (invierno y temporadas secas), debido a que entran en diapausa durante esos periodos. Otro mecanismo de supervivencia es la transmisión vertical, en la cual el mosquito hembra infectado transmite el virus a su progenie de forma transovárica o a través de los huevos, esa progenie transmite el virus por picadura, iniciando un nuevo ciclo de transmisión (13).

En condiciones experimentales, el VON ha sido aislado de garrapatas del género *Argas*, *Ornithodoros* y *Dermacenter* en Europa, y se ha demostrado que es capaz de transmitir la enfermedad a las aves, sin embargo dichas pruebas como vector en Norteamérica han sido negativas. Aunque la infección del VON ha sido observada en una gran variedad de mamíferos, solo el lemur (*Lemur fulvus*) podría mantener ciclos de transmisión locales (9).

La expansión del VON en América ha favorecido el contacto con numerosas especies de mosquitos, muchas de las cuales nunca habían tenido contacto con el virus, es por ello que debe investigarse si esas especies pueden actuar como vectores para transmitir el VON (13).

RESERVORIOS.

En general, las especies de aves del orden Passeriformes parecen ser los reservorios ideales para la transmisión del VON; sin embargo, también intervienen otras ordenes (9). La mortalidad varía en términos de especies, familias y ordenes afectadas, pero entre los Corvidos es particularmente alta (8). Las aves que enferman muestran signos tales como letargia, falta de postura, de control motor y ataxia, seguida de la muerte en 24 horas (9). La mortalidad presentada por las aves afectadas en Norteamérica probablemente se deba a la combinación de varios factores, como la falta de exposición previa al virus, ausencia de inmunidad y posiblemente al aumento en la virulencia de la cepa del virus (9). Se ha documentado la infección por VON en 138 especies de aves tan sólo en Estados Unidos, ésta gran diversidad de huéspedes puede explicar la facilidad del VON para diseminarse a diferentes ecosistemas (14).

Estudios y observaciones realizadas en Europa, África y América, hacen suponer que la migración de aves tiene un papel importante en el mecanismo de diseminación del VON (15).

Análisis genéticos indican un alto grado de relación entre las cepas de VON aisladas de sitios de partida y de arribo en las rutas de diferentes aves migratorias entre África y Europa, regiones separadas por miles de km (14).

Considerando esto, las rutas migratorias son clave en la dinámica del virus. Las aves del este de E.U. migran a gran parte del Caribe, Sudamérica y partes bajas del Atlántico. Las aves del oeste de EU generalmente migran hacia México y América Central, siendo el primero el punto de interconexión entre varias rutas migratorias (9).

La costa del Golfo de México es la principal ruta migratoria de muchas especies de aves provenientes del noreste, oeste y sur de los Estados Unidos, por lo que existe la hipótesis de que el VON pudo haber sido introducido a México por este mecanismo o gradualmente en una dispersión hacia el sur por el movimiento de aves a corta distancia y entonces entrar por los Estados del Norte (16).

ESPECIES AFECTADAS.

El VON produce la enfermedad llamada Fiebre del Nilo Occidental (FNO) que afecta a aves, mamíferos y humanos en diferente magnitud. Los caballos y humanos son considerados huéspedes terminales y poco se conoce acerca de la duración y magnitud de la viremia (17).

Algunas infecciones en humanos y caballos son asintomáticas o con signos febriles no específicos; sin embargo, puede desarrollarse meningitis o encefalitis con porcentajes de mortalidad reportados entre 26 y 43% en humanos y 9 a 16% en caballos (14).

Con respecto a la infección en caballos, hay estudios que sugieren que las viremias son de baja magnitud y corta duración. Como consecuencia, los caballos infectados no actúan como amplificadores (8, 18). El periodo de incubación es de 3 a 15 días (19). La encefalitis se presenta sólo en un pequeño porcentaje de caballos por lo que pocos desarrollan los signos clínicos de la enfermedad, los cuales incluyen varios grados de ataxia, postración, dificultad para incorporarse, fasciculación muscular, labio colgante o paralizado, espasmos faciales o del hocico, rechinado de dientes y ceguera. Los signos clínicos progresan en cinco a diez días (6,18,19) y el porcentaje de letalidad es de 33% (19).

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

El diagnóstico clínico diferencial incluye otras arbovirosis como encefalitis equina venezolana, encefalitis equina del este, encefalitis equina del oeste y encefalitis de San Luis, botulismo y rabia (8, 18).

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.

El aislamiento del virus en equinos puede realizarse fácilmente a partir de muestras de cerebro y médula espinal de un animal afectado. Para aves se requiere de dichos tejidos, incluyendo corazón e intestino. El virus debe propagarse en cultivos celulares susceptibles tales como riñón de conejo (RK-13) o riñón de mono verde africano (Vero) y esperar a observar los efectos citopáticos. La confirmación del aislamiento se hace por anticuerpos fluorescentes o detección de ácido nucleico (19).

La técnica de inmunohistoquímica a partir de tejidos fijados con formalina es confiable para la identificación de la infección por VON en aves; por el contrario, el 50% de los casos en equinos resultan como falsos negativos (19).

Se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa a partir de cerebro y médula espinal fresca de caballos. Además, también se puede realizar la extracción de RNA viral a partir de los tejidos (19).

El diagnóstico serológico de VON se realiza en el suero equino utilizando la técnica inmunoenzimática (ELISA) para detección de anticuerpos IgM e IgG así como inhibición a la hemoaglutinación (IH). La técnica de ELISA funciona como prueba tamiz para la detección de VON. Los anticuerpos IgM específicos para VON en equinos son detectables desde los 10 días hasta 1 ó 2 meses post-infección. Los anticuerpos neutralizantes pueden persistir por más de un año. La prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) es utilizada para confirmación por ser más específica. Para la interpretación de los resultados, se deben considerar los antecedentes de vacunación (19).

INDICADORES DE RIESGO.

La epidemiología del VON varía por región, pues es un reflejo de las condiciones ambientales propias del lugar así como de la presencia y abundancia tanto de huéspedes como de vectores. En todas las áreas donde se presenta la transmisión viral, usualmente ocurre durante las estaciones con altas temperaturas y temporada de lluvias, esto a su vez se relaciona con una alta densidad de mosquitos (20, 21). Los vertebrados silvestres

son esenciales para el mantenimiento natural, amplificación y diseminación del VON y deben sobrevivir para asegurar la transmisión efectiva del virus (6,8).

Las condiciones propicias para que pueda ocurrir una epizootia en alguna población de aves incluyen la temperatura del lugar, las especies y la densidad de mosquitos presentes, número y distribución de huéspedes susceptibles, así como su estado inmunológico, entre otras (6,12,14).

SITUACIÓN DEL VON EN MEXICO.

En México se tiene evidencia de la presencia del VON a través de informes serológicos en diferentes Estados y por el aislamiento viral (22).

Se considera que Yucatán es un punto de incursión del VON hacia Latinoamérica porque es una de las principales áreas a las que arriban muchas especies de aves del noreste y medio oeste de E.U. En este Estado se tuvo evidencia serológica en tres equinos muestreados durante 2002. Ese mismo año en Coahuila se encontraron 15 equinos positivos, de éstos, 5 habían tenido manifestaciones nerviosas (22).

Los informes de Yucatán y Coahuila fueron los primeros estudios publicados acerca de la actividad del VON en caballos en México (23).

Así mismo en aves se obtuvo serología positiva en el Estado de Nuevo León y Tamaulipas durante el 2003 (16,23).

Durante el verano de 2002 se recibieron informes de encefalitis en caballos de diferentes lugares del país por lo que se realizó un estudio serológico de julio de 2002 a marzo de 2003. Se muestrearon 441 equinos de 14 Estados y en 97 (22%) muestras se detectaron anticuerpos específicos contra el VON. El muestreo se llevó a cabo en hatos donde había animales con historias clínicas de encefalitis. Las muestras positivas provinieron de diferentes municipios de los Estados de Tabasco, Coahuila, Tamaulipas, Chihuahua, Veracruz y Yucatán (24).

En mayo de 2003, la CPA recibió el reporte de la muerte de un cuervo común en un zoológico de Villa Hermosa, Tabasco, del cual se logró el primer aislamiento del VON en el país (23, 25). En ese año se realizaron otros aislamientos en México: el 12 de noviembre a partir de un encéfalo equino en el municipio de Aldama, Tamaulipas; el 27 de noviembre se aisló de un zanate en Hermosillo, Sonora; el 28 de noviembre de un pelícano en Altamira, Tamaulipas; el 5 de diciembre en 6 aves migratorias de Mexicali, B.C; el 24 de diciembre en 2 lagartos de Tabasco. El último aislamiento fue en un cuervo de Tecate B.C el 7 de septiembre de 2004 (25).

Debido a esta situación, en el 2003 las autoridades mexicanas a través de un Acuerdo, declararon la presencia en el territorio nacional del Virus del Oeste del Nilo, motivo por el cual se puso en operación el Dispositivo Nacional de Emergencia en Sanidad Animal y se instrumentó el Comité intersectorial conformado por la Secretaría de Salud, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación y la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, con el propósito de vigilar, diagnosticar, prevenir y controlar al virus y disminuir el impacto económico y social que pudiera causar al país (27).

MEDIDAS DE VIGILANCIA, PREVENCIÓN Y CONTROL.

Las medidas zoonositarias de aplicación coordinada para la vigilancia, prevención y control del VON en México, de conformidad con la Ley Federal de Sanidad Animal son: la educación en materia zoonositaria; la inmunización de la población equina, previa autorización de la Secretaría. El reporte inmediato de casos sospechosos; control de la movilización de equinos, aves domésticas y silvestres en cautiverio, de explotaciones con resultados positivos al aislamiento viral. Diagnóstico e identificación del VON; cuarentena y aislamiento; participación en programas de control de vectores en conjunto con la Secretaría de Salud. Instrumentación de un programa de centinela en conjunto con la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Vigilancia e investigación epidemiológica y las demás que conforme a la tecnología y adelantos científicos sean eficientes para dicho fin (26, 27).

Para la prevención de la enfermedad del VON existe la vacuna elaborada con la cepa TM-171-03 inactivada con beta propiolactona. Puede ser utilizada en caballos, burros y mulas vía intramuscular en dosis de 2 ml. Puede administrarse a partir del 3er mes de edad, una segunda dosis en un intervalo de 21 días y revacunar cada año. La Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) es la encargada de su producción y distribución en todo el país (28).

Por otro lado, los laboratorios Fort Dodge Animal Health importan a México vacuna contra VON que está siendo utilizada en las campañas de control tanto de los Estados Unidos como de Canadá con gran eficacia. Dicha vacuna está elaborada con virus inactivado y los fabricantes afirman que es segura con hasta un 94% de efectividad.

Así mismo, el Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) colaboró con dicha empresa para desarrollar la primera vacuna DNA, la cual es la primera en el mundo con licencia que utiliza fragmentos específicos del material genético del VON para estimular una respuesta inmune en los caballos. Entre las ventajas de este producto se encuentran que es poco vulnerable a cambios de temperatura además de que los caballos que han recibido la vacunación pueden distinguirse de los infectados con virus de campo, lo cual es importante en acciones de vigilancia (29).

2. JUSTIFICACION

El VON es un agente cuyo comportamiento en México ha sido confuso pues a pesar de haberse aislado de aves, lagartos y un equino en diferentes estados del país, desde 2003 no ha afectado de manera importante a ninguna especie; sin embargo, su situación es incierta.

No existen estudios en los que se haya cuantificado realmente esta enfermedad en alguna especie y en aquellos donde se describe serovigilancia es posible que se sobreestimen los resultados por estar basados en casos clínicos de encefalitis. Además, los muestreos en los que basan sus resultados fueron realizados con largos intervalos de tiempo, suficientes para permitir la variación de condiciones ambientales que influyen en la densidad de vectores y en la respuesta inmunológica de los animales. Los informes en caballos, presentan carencia de la historia clínica, la consideración de vacunados o no contra VON y que los tamaños de muestra de animales son muy pequeños para llegar a ser representativos de un Estado.

Es probable que la presentación de la enfermedad en caballos no sería el problema principal que produciría el VON en México, las consecuencias económicas podrían ser altas debido a las medidas de restricción de movimiento que se implementarían, así como a la cuarentena y aislamiento de los animales. Esto a su vez ocasionaría la cancelación de exhibiciones de caballos, caballadas y otras actividades ecuestres y labores de campo. Debido a esto, es necesario reconocer aquellos indicadores que al estar presentes en un ecosistema aumentan el riesgo de contacto de un equino con el VON, si es que éste estuviera presente.

Por todo lo anterior, resulta importante explicar la situación serológica y de riesgo actual del VON en la región de Aldama, Tamaulipas, lugar en el que se realizó el único aislamiento de VON en un caballo, lo cual daría pauta al inicio de una vigilancia confiable de este agente en el país.

Por otro lado, es necesario contar con técnicas de diagnóstico que puedan ser implementadas en laboratorios con Nivel 2 de bioseguridad, para el seguimiento y vigilancia de éste agente.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de anticuerpos e identificar factores de riesgo que condicionan la posible existencia del VON en caballos de la zona de Aldama, Tamaulipas, durante la temporada de lluvias del año 2006.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Establecer el tamaño mínimo de muestra de caballos y el tipo de muestreo de unidades de producción de Aldama que se requieren para obtención de suero.
- b) Diseñar un cuestionario para obtener información sobre los posibles factores de riesgo así como datos de los animales muestreados.
- c) Realizar muestreo serológico de caballos en Unidades de Producción de Aldama, Tamaulipas y coleccionar información sobre los posibles factores de riesgo.
- d) Realizar el diagnóstico serológico de las muestras utilizando las técnicas de ELISA para detección de anticuerpos IgM e IgG y la técnica de PRNT.
- e) Analizar la concordancia entre las técnicas de ELISA para IgG y PRNT.
- f) Obtener la prevalencia de anticuerpos a partir de los resultados serológicos.
- g) Analizar e identificar los factores de riesgo asociados a la posible existencia de VON en Aldama estimando la razón de probabilidades y mediante la prueba de chi-cuadrada.
- h) Analizar en un modelo de regresión logística las variables significativas.
- i) Determinar la distribución geográfica de UP con animales positivos a la serología para VON en la zona de estudio con el uso de un Sistema de Posicionamiento Global y un Sistema de Información Geográfica.

4. HIPOTESIS

Existen factores de riesgo que participan de manera importante en la prevalencia de anticuerpos para el VON en el municipio de Aldama, Tamaulipas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

UBICACIÓN ESPACIAL.

La investigación, de tipo transversal, se realizó en el sureste del Estado de Tamaulipas, México, en la zona donde convergen los municipios de Aldama, Altamira y González (Anexo 1). Los primeros dos municipios limitan al este con el Golfo de México. En la región el clima es cálido húmedo y subhúmedo. En las partes más elevadas la vegetación es de tipo selva baja caducifolia mientras que en los valles o partes bajas está constituida de pastos naturales. La temperatura media anual fluctúa de 24.6 °C a 26.5°C; las medias mensuales más altas se registran en junio y agosto con 29.4°C y la más baja en enero con 19.4°C. La precipitación anual varía de 788.6 mm a 1044.10 mm y el mes más lluvioso es junio con 218.90 mm (30, 31).

POBLACIÓN.

La población equina de los tres municipios se informó en 2006 de 15,000 animales, según datos oficiales de la Región III de la CPA.

OBTENCIÓN DEL TAMAÑO MÍNIMO DE MUESTRA (TMM) DE CABALLOS Y TIPO DE MUESTREO.

El número de animales necesarios para conformar el TMM se determinó utilizando la siguiente ecuación (32):

$$n = (1 - p) / (p V)$$

Donde:

p= proporción esperada de que suceda el evento o prevalencia.

V= error estándar del estimador.

Se consideró un 10% de prevalencia¹, y un error máximo de 0.03. De ésta forma se determinó evaluar 300 caballos.

¹ Basado en los resultados no publicados de un estudio piloto realizado en diciembre de 2003 por el INIFAP en el cual, de 48 caballos muestreados, 5 resultaron positivos en Aldama, Tamps.

Para el muestreo se requirió visitar las unidades de producción (UP) necesarias en la zona de estudio para completar el TMM. La selección de las UP se realizó de manera no probabilística, por conveniencia con productores cooperantes que permitían realizar el muestreo y dentro del área de influencia del Campo Experimental Aldama del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Se excluyeron aquellos animales vacunados contra el VON de 2004 a la fecha así como menores de 1 año y animales de difícil manejo.

DISEÑO DEL CUESTIONARIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO.

Para identificar factores de riesgo asociados a la posible existencia del VON en el lugar de estudio se diseñó un cuestionario para coleccionar información en las UP donde serían muestreados los caballos.

Dicha información se basó en la historia natural de la enfermedad y las preguntas se diseñaron de tal forma que se obtuviera fácilmente la respuesta de las variables.

El cuestionario se tituló: *Muestreo serológico de caballos*, con la finalidad de que los productores o personas a quienes se les aplicaba, no sesgaran sus respuestas si leían algo sobre el VON al iniciar la entrevista.

La información considerada para el diseño de los cuestionarios se clasificó en 2 secciones: I. Datos de la explotación o unidad productiva y II. Datos de los caballos muestreados. Las variables probables a ser factores de riesgo fueron consideradas en ambas secciones. Así mismo se elaboró un instructivo para el llenado del cuestionario. El cuestionario se muestra en el Anexo 2 y el instructivo de llenado en el Anexo 3.

También se especificó en una leyenda la confidencialidad de los datos brindados, de esta manera también se garantizó cierta veracidad en las respuestas.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y LEVANTAMIENTO DE CUESTIONARIOS.

El muestreo de los animales se realizó durante la última semana del mes de septiembre y la primera del mes de octubre de 2006, durante la época de lluvias.

Para la obtención de los sueros se tomó una muestra de sangre de la vena yugular de los animales utilizando tubos vacutainer con vacío y agujas desechables. Una vez formado el coágulo, los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos. Los sueros fueron separados en 2 viales cada uno, fueron identificados por número de UP y número de animal y almacenados en congelación; los sueros, se trasladaron en cadena fría a no más de 4°C y fueron almacenados a -70°C, hasta su procesamiento.

A su vez, en cada UP visitada se levantó un cuestionario a la persona responsable. Los cuestionarios, en todos los casos, fueron aplicados por la misma persona.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE MUESTRAS.

Detección de anticuerpos IgG:

Técnica de ELISA 1. La metodología de la técnica de ELISA – Indirecto (ELISA-I) para detección de anticuerpos IgG, fue adaptada para realizar el diagnóstico del VON en un laboratorio con bioseguridad de nivel 2. Para esto, el antígeno empleado fue inactivado por dos métodos: inactivación química con β -propiolactona e inactivación física con radiación gamma.

Para realizar la técnica fueron utilizadas microplacas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano como fase inmunoabsorbente. Los sueros testigo (positivo, débil positivo y negativo) fueron seleccionados de sueros probados por la técnica de PRNT.

En cada ensayo se verificaron los tiempos de incubación, el número de lavados, se controló la temperatura y se utilizó el procedimiento descrito en el Anexo 4. Los sueros fueron colocados como se muestra en el Anexo 5 y los reactivos utilizados se detallan en el Anexo 6.

Técnica de ELISA 2. En el laboratorio de Alta Seguridad nivel 3 de la Comisión México Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales (CPA), se procesaron todos los sueros con la técnica de ELISA-I, que se utiliza de rutina para el diagnóstico.

El procedimiento que se siguió fue el mismo que el de la ELISA ya descrito, pero los sueros se trabajaron en el orden que muestra el Anexo 7. La lectura se realizó en un lector automático con filtro de 450 nm.

Detección de anticuerpos IgM:

Todos los sueros fueron probados por la técnica de ELISA para detección de anticuerpos IgM siguiendo el procedimiento utilizado en el laboratorio de Alta Seguridad nivel 3.

Técnica confirmatoria *Prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT):*

Para su desarrollo se requirieron dos botellas de 25 cm² con cultivo de células VERO por cada suero problema, dos botellas para el testigo positivo, dos para el testigo negativo, una para el testigo de células, cinco para la dilución de trabajo y una para la dilución del virus 10⁻¹.

Los cultivos celulares fueron sembrados 48 a 72 horas antes de trabajar los ensayos. Esto se hizo en placas de fondo plano con 96 pozos donde se prepararon diluciones 1:10 y 1:100 del suero con medio celular y se mezclaron con una concentración del virus titulada en 100 unidades formadoras de placas (UFP). Estas diluciones se incubaron durante 1 hora a 37°C.

Posteriormente, la mezcla virus-suero se inoculó sobre los cultivos celulares y las botellas se incubaron por una hora a 37°C sobre un agitador de placas. Terminada la incubación se añadieron 5 ml de solución con agar noble a cada botella y una vez solidificado sobre el monoestrato, permanecieron en incubación por dos días a 37°C.

Por último, se añadió una segunda capa de agar, la cual contenía colorante rojo neutro como indicador. Después de incubar otro día a 37°C, se realizó la lectura de cada botella observando la formación de placas producidas por el virus en sueros negativos. En caso de que el suero problema tuviera anticuerpos contra el VON, el número de placas se reducía 90% o más con respecto a las botellas de testigo negativo de virus.

Diagnóstico diferencial:

Por manejarse de rutina como diferencial para VON, en el laboratorio de Alta Seguridad también se realizó la técnica de inhibición a la hemoaglutinación (IHA) para diagnóstico de encefalitis equina del este (EEE) y venezolana (EEV).

ANÁLISIS DE DATOS.

La información colectada en los cuestionarios y los resultados del diagnóstico fue almacenada para su análisis en bases de datos elaboradas en hojas de cálculo del Programa Microsoft Excel. Se construyó una base de datos por individuo y una por UP.

En cuanto a las técnicas diagnósticas, se calculó la concordancia entre las técnicas ELISA 1 y ELISA 2, así como de éstas con respecto a la técnica de PRNT (Prueba de Oro) en sus dos diluciones, utilizando la prueba de Kappa.

La prevalencia se determinó con el número de animales positivos a la técnica confirmatoria sobre el total de animales muestreados. Así mismo, se determinó como positiva aquella UP en la que se encontraba al menos un caballo positivo serológicamente a la técnica confirmatoria. Una vez clasificadas las UP en positivas y negativas, se obtuvo la prevalencia a nivel de UP en relación al total de UP visitadas.

Se realizó un análisis descriptivo de los individuos muestreados así como de las UP, considerando la información registrada en el cuestionario.

La variable dependiente fue el resultado del diagnóstico serológico por la técnica confirmatoria de PRNT en dilución 1:100. Esta variable fue de tipo dicotómico con valor de positivo o negativo.

A nivel de individuo las variables independientes consideradas fueron: sexo, edad, función zootécnica y movilización.

A nivel de UP, las variables independientes consideradas fueron: altitud, municipio, finalidad de la UP, tipo de alojamiento de día y de noche de los caballos, vegetación predominante en la UP, presencia de depósitos naturales de agua y tipo (léntico –sin movimiento propio como charcos y lagos-, lótico –con movimiento propio como ríos y arroyos-, ambos o ninguno), presencia de depósitos artificiales de agua y tipo (cachivaches, bebederos, pozos, zanjas, presas), presencia de aves silvestres, presencia de aves muertas y presencia de mosquitos.

Posteriormente se midió la asociación entre un factor de riesgo determinado y la presencia o ausencia de anticuerpos contra el VON. Mediante la elaboración de tablas de contingencia, se estimó la razón de probabilidades (OR) y la significancia estadística fue evaluada mediante la prueba de chi-cuadrada (Prueba de Independencia).

Finalmente, aquellas variables que resultaron significativas con valor de $P \leq 0.1$ fueron consideradas para un modelo de regresión logística.

El programa de cómputo estadístico utilizados fue Epiinfo versión 3.4.1 (2007).

UBICACIÓN GEOGRAFICA DE LAS UP CON ANIMALES POSITIVOS A LA SEROLOGÍA.

Durante el muestreo se registraron los datos de geoposicionamiento (longitud, latitud y altitud) de cada UP a través de un Sistema de Posicionamiento Global (SPG) (Anexo 8).

Con la localización exacta de las UP visitadas y, una vez teniendo los resultados de la serología, se identificaron las UP con ausencia y presencia de anticuerpos para establecer los posibles patrones espaciales del VON en la población de estudio.

6. RESULTADOS

Se evaluaron 300 sueros de caballo de 45 UP en tres municipios del Estado de Tamaulipas. Dichas muestras corresponden al 2% del total de la población equina de la región. Aldama fue el municipio donde se obtuvieron el mayor número de muestras (Cuadro 1). De acuerdo a su altitud, las UP estuvieron localizadas desde los 9 hasta los 144 msnm.

DESCRIPCIÓN DE LAS UP.

Finalidad zootécnica de las UP visitadas. La principal actividad de las UP fue la engorda de bovinos (93%). (Cuadro 2).

Casos. En ninguna UP se informó de caballos con signos nerviosos en los últimos 3 años.

Alojamiento de los caballos. En 8 UP (18%) los caballos eran alojados en caballerizas, de éstas, en 7 era durante la noche y 1 durante el día. Dichas caballerizas no contaban con ninguna protección contra mosquitos. En el resto de las UP, los caballos permanecían a la intemperie en corrales y potreros.

Vegetación predominante en la UP. En 3 UP (7%) se encontró vegetación considerada nativa y el resto (93%) contaba con vegetación introducida, principalmente sábila y pastura para los bovinos.

Depósitos naturales de agua. En 26 UP (57%) se observaron depósitos naturales de agua dentro de sus instalaciones. Cuadro 3.

Depósitos artificiales de agua. En todas las UP visitadas se observó al menos algún tipo de depósito artificial de agua como cachivaches, bebederos, pozos, zanjas y presas. (Cuadro 3).

Presencia de aves silvestres o migratorias. En 35 UP (78%) se informó la presencia de aves silvestres dentro de sus instalaciones, principalmente de gansos y pelícanos. Nueve de dichas UP también mencionaron que habían encontrado este tipo de aves muertas durante el año del muestreo.

Presencia de mosquitos. Las 45 UP informaron de la presencia de mosquitos dentro de sus instalaciones, aunque en 32 dijeron que había “muchos” y en 13 que había “pocos”, esto fue con base en las molestias que les ocasionaba a las personas que vivían o laboraban en ellas.

DIAGNOSTICO SEROLÓGICO DE MUESTRAS.

Todas las pruebas utilizadas para el diagnóstico mostraron variaciones en las frecuencias de positividad del 30% al 66%, siendo la técnica de PRNT en dilución 1:10 en la que se obtuvo el mayor número de positivos. Aunque el diagnóstico definitivo se realizó con la dilución 1:100 resultando 89 (30%) sueros positivos. (Cuadro 4).

En cuanto a la detección de anticuerpos tempranos (IgM), se encontraron 15 (5%) sueros positivos, de éstos, 8 (3%) fueron positivos a PRNT dilución 1:100.

La concordancia entre las diferentes técnicas para el diagnóstico del VON se muestra en el Cuadro 5. La mejor concordancia obtenida fue entre la ELISA 2 y la técnica de PRNT en dilución 1:10 (Kappa= 0.716, P=0.00001). Con la técnica de PRNT en dilución 1:100 (considerada Prueba de Oro) hubo una concordancia pobre (Kappa= 0.349, P=0.00001).

Para el diagnóstico de otras encefalitis, resultaron positivos 14 (5%) sueros para encefalitis equina del este y 14 (5%) para la encefalitis equina venezolana.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS VARIABLES.

Con base en la técnica de PRNT dilución 1:100, la *prevalencia* de anticuerpos en los caballos estudiados fue de 30% (89 positivos). El número promedio de animales muestreados por rancho fue de 7 con un rango de 1 y hasta 54.

En cuanto a las variables por individuo los resultados fueron:

Sexo. El número de hembras positivas fue de 41 (33%) y de machos fue de 48 (27%). No se encontró diferencia significativa entre sexo y la positividad ($P > 0.05$). (Cuadro 6).

Función zootécnica. 76 (32%) animales utilizados para trabajo fueron positivos mientras que de los utilizados para cría, 13 (20%) fueron positivos. La significancia estadística encontrada en relación a la positividad con esta variable fue de $P=0.053$. (Cuadro 6).

Movilización. En cuanto a la fecha y lugar de movilización, del total de caballos, sólo en 8 (3%) indicaron que habían sido movilizados durante el 2006, 6 de ellos durante febrero y 2 en marzo. Los caballos salieron del Estado a eventos llamados caballadas en los que reúnen caballos de diferentes zonas del país. De los 8 animales 2 fueron positivos para VON. No se encontró significancia estadística en relación a la positividad ($P > 0.05$) (Cuadro 6).

Edad. La edad promedio de los animales fue de 10.5 años (126 meses). Resalta el hecho que sólo resultaron positivos aquellos de 36 meses de edad en adelante. (Cuadro 7).

La *prevalencia* obtenida a nivel de UP fue de 82% (37 UP). La positividad de caballos en cada UP fue variable siendo 10 el número máximo de animales positivos encontrados en una misma UP.

En cuanto a las variables por UP:

Se encontró que a mayor altitud hubo una mayor frecuencia de positividad ($P=0.0002$).

Con relación a los municipios, no se encontró diferencia significativa entre la frecuencia de positividad de las UP en cada uno de ellos ($P > 0.05$). (Cuadro 8).

El análisis de las variables por individuo para determinar los factores de riesgo se muestran en el Cuadro 9. La variable en la que se encontró diferencia significativa fue la ausencia de depósitos naturales de agua dentro de la UP (P= 0.016).

El análisis por UP de las variables para determinar los factores de riesgo se muestran en el Cuadro 10. No se encontró ninguna variable estadísticamente significativa para considerarse como un riesgo a nivel de UP (P > 0.05).

Las variables consideradas para el modelo de regresión logística fueron: ausencia de depósitos naturales de agua, función zootécnica y altitud (msnm).

De las tres variables consideradas, la única que mantuvo su significancia fue altitud (msnm) (P=0.0035) (Cuadro 11), por lo que la función del análisis de regresión logística se expresó de la siguiente manera:

$$y = \frac{1}{1 + \exp(-2.0589 - 0.0115 X_1)}$$

La ubicación geográfica de las UP con caballos positivos a la serología en relación a la altitud se muestra en el Anexo 9.

7. DISCUSIÓN

La frecuencia del 30% de animales con anticuerpos para el VON calculada para la zona de estudio se encuentra dentro del rango determinado en estudios realizados por Estrada y col (24) y Blitvich y col (23) (22 y 62.5%) realizados en México, con la diferencia de que sus resultados fueron basados en el diagnóstico de casos clínicos, mientras que en el presente estudio, fueron evaluados caballos asintomáticos de UP sin antecedentes de signos nerviosos.

En otros países, también se han muestreado caballos asintomáticos para estudios de vigilancia y se han encontrado frecuencias de 53% en Cuba, 39% en Guatemala y 11% en Colombia con tamaños de muestra de 210, 352 y 130 animales respectivamente (34, 35, 36).

La mayoría de las UP visitadas, tuvieron como principal actividad la engorda de bovinos, lo cual coincide con lo informado por el Gobierno del Estado (37) ya que es la principal actividad económica en la región.

En un estudio para determinar factores de riesgo en humanos (38), resultó significativo el hecho de que en las casas no existiera o se mantuviera abierta la protección contra mosquitos así como la exposición de la gente al aire libre durante el amanecer o el atardecer. A pesar de lo anterior, la permanencia en caballerizas o a la intemperie de los animales en el presente estudio no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$).

La importancia del tipo de vegetación en la UP es debida a que tiene gran influencia en la cantidad y variedad de vectores ya que éstos se alimentan del néctar y fluidos vegetales para su manutención metabólica (39). Esto se observó en Chicago en 2002, donde se encontró que los casos de enfermedad humana se presentaban con mayor frecuencia en áreas con más vegetación (40) y coincide con un estudio hecho por Brownstein (44) en el cual determinó por un análisis espacial y sistemas de información geográfica, que regiones con abundante vegetación estaban asociadas a la presentación de casos humanos. Aún así, en el presente estudio, no se encontró significativa esta variable.

Con relación a la presencia de depósitos naturales de agua como otro posible factor de riesgo, la frecuencia de positividad en lugares sin este tipo de depósitos resultó significativo ($P= 0.016$). Esto podría en principio parecer contradictorio, sin embargo, podría atribuirse a que en la zona son más utilizadas las fuentes artificiales de agua. En consecuencia, el factor de riesgo sería entonces la mayor presencia de depósitos artificiales de agua, lo cual no pudo demostrarse estadísticamente porque todas las UP tuvieron al menos algún tipo de depósito artificial, es por ello que sería recomendable cuantificar la presencia de éste tipo de depósitos.

Otra posible explicación del menor riesgo en lugares con fuentes naturales es que los observados en el estudio tienen movimiento, es decir, eran ríos y arroyos los cuales llevaban una corriente, además los charcos y pasto anegado, que circunstancialmente se observaron en las UP, no son permanentes pues al ir cambiando la temperatura del ambiente a lo largo del día y del año, puede ir disminuyendo el nivel del agua e incluso desaparecer, condiciones que no son favorables para el ciclo del mosquito (39). Por el contrario, los depósitos artificiales de agua pueden almacenar y mantener estancada el agua por lapsos mayores de tiempo, suficientes para completar uno o varios ciclos de mosquitos (5, 39, 46).

Loeb y col (38) consideraron como factor de riesgo en humanos la presencia de todos los objetos donde pudiera acumularse agua y consideraron la costumbre de drenar el agua de dichos objetos, así como mantener cunetas y desniveles limpios. Sin embargo, en sus resultados no encontró diferencias significativas con aquellas que no lo hacían. Este hecho difiere con los conocimientos sobre el tipo de manejo de los depósitos, el cuál es básico para evitar la formación de criaderos de mosquitos, no sólo para prevenir el VON (8), sino otras enfermedades transmitidas por vectores, la más importante en México para el humano es el dengue (5, 46).

Las aves silvestres son otro factor potencial en la transmisión, aunque no fue significativa su presencia y la positividad en las UP estudiadas, Kormar y col (41) señalan que son los huéspedes más importantes para la amplificación del virus. Cabe destacar que durante el muestreo se observó que aves silvestres migratorias tales como pelícanos (*Pelecanus sp*) y gansos (*Anser sp*), tienen estrecha convivencia con los animales en los potreros y

corrales. A este respecto McLean y col (6) mencionan que los gansos pueden sufrir altas viremias y pueden contribuir a la amplificación del virus, lo cual contrasta con lo que menciona Hayes y col (40), acerca de que los Anseriformes no desarrollan un nivel suficiente de viremia para que un mosquito pueda diseminar la enfermedad. De cualquier modo, en la zona están presentes este tipo de aves.

El monitoreo de las aves es fundamental para la vigilancia y prevención de casos en cualquier especie, Ramos y Falcón (42) mencionan que la presencia de aves infectadas generalmente precede a la aparición de casos en humanos y en otros animales. Este hecho también fue observado en Ontario (2002) cuando ocurrió la muerte de cuervos 5 semanas antes de informarse casos humanos (38).

Según Han, Hayes y Huhn (40, 43, 45), el factor de riesgo más importante para adquirir la infección por VON en humanos es la exposición a mosquitos infectados, en caballos esta variable no pudo ser analizada estadísticamente porque en todas las UP se informó la presencia de mosquitos, lo cual no deja de ser relevante, pues bajo esta condición, todas las UP podrían estar expuestas al riesgo de que éstos se encuentren infectados.

En un estudio que realizó el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) en el año 2002, se realizó la búsqueda e identificación de mosquitos en diferentes municipios del Estado de Tamaulipas y, en el municipio de Aldama, se encontraron las especies *Aedes aegypti*, *Culex coronator* y *Culex sp* las cuales, según estudios publicados, pueden actuar como vectores para el VON en América (40, 46), sin olvidar que además *Aedes aegypti* es el principal vector de dengue (5,39, 46). Estas especies se consideran domésticas pues se caracterizan por reproducirse en recipientes artificiales alrededor del hábitat humano y su radio de vuelo es de pocos metros por lo que su presencia es un indicio de que los criaderos están a los alrededores (46).

Dada la existencia de éstas especies, es necesario desarrollar una línea de investigación que se enfoque a la captura e identificación de mosquitos de diferentes zonas del país y tratar de aislar el virus en éstos. De hecho, en el Estado de Nuevo León ya se aisló el

virus a partir de mosquitos *Culex quinquefasciatus* colectados en 2003 (47). Dicha especie es un vector reconocido en Estados Unidos para la transmisión del VON (40).

En el estudio, resaltó el hecho de no detectar animales positivos menores de 30 meses de edad, esto aún cuando parece evidente que está circulando el virus, ya que se encontró serología positiva para detección de IgM. En humanos, Nash y col (48) menciona que a cualquier edad una persona es susceptible a la infección por VON, pero el riesgo para la presentación neuroinvasiva se incrementa con la edad del paciente, lo cual ha resultado significativo en estudios hechos por Murray y col y Tsai y col (49, 50). Es recomendable contar con la historia clínica completa de un equino cuando se presente un caso, para llevar un registro completo y poder evaluar este tipo de aspectos.

En cuanto al riesgo por sexo, los resultados no fueron significativos y no se encontraron estudios en los que se haya encontrado alguna relación entre la positividad y el sexo de los caballos. En humanos, Jean y col (51) encontró que los hombres tienen mayor riesgo de presentar la enfermedad neuroinvasiva una vez infectados con VON.

Sobre la relación que podría guardar la función zootécnica de un caballo y la positividad para VON, no se encontró literatura al respecto, aunque cabe mencionar que el manejo de los animales puede influir en la adquisición de la infección ya que puede favorecer una mayor exposición a los mosquitos. Este fenómeno fue observado por Loeb y col (38) en humanos, pues se demostró que el permanecer fuera de las casas al amanecer o al atardecer es un factor de riesgo, es decir, hay un mayor tiempo de exposición al ambiente en horas en las que se alimentan con mayor frecuencia los mosquitos hembra.

Considerando los datos de movilización de los animales, los caballos positivos fueron infectados localmente porque de 8 que resultaron positivos a la serología, 6 no fueron movilizados el año del muestreo. En este sentido, los datos de movilización han sido considerados por otros autores para rastrear el origen de la infección o contacto viral (23).

Un factor importante para varios autores (40, 49, 52, 53) pero que no pudo ser considerado fue el estado inmunológico. En el caso de los humanos, se tiene la hipótesis de que existe cierto grado de protección en países como México, en El Caribe, Centro y

Sudamérica por la presencia del virus del dengue, éstos anticuerpos podrían conferir protección temporal contra el VON o asociarse a casos poco severos (42). Una situación similar podría estar pasando en el caso de los caballos pero con el virus de la Encefalitis de San Luis, lo cual permitiría explicar la ausencia de signología en positivos (54). Este supuesto, se apoya en un estudio hecho en pinzones, los cuales fueron expuestos al virus de San Luis y en una inoculación posterior con este virus se previno la viremia para este virus y se redujo el título para la viremia de VON, se observó una gran respuesta inmunológica para este virus (55).

También se sabe, por la secuencia del genoma de la cepa TM171-03 aislada de un cuervo en México, que el virus ha sufrido mutaciones comparado con la cepa 382-99 de Nueva York y según Barret, ha traído como consecuencia su atenuación (40, 54), probablemente también sea por eso que no ha tenido un fuerte impacto en la salud de los animales y humanos.

El porcentaje de caballos infectados por VON que desarrollan signos de la enfermedad es relativamente bajo (8), lo mismo encontró Murphy y *col* (56) en un estudio en humanos en el que una minoría de personas infectadas por el VON desarrollaron síntomas de la enfermedad, como consecuencia, según un estudio hecho por Zohrabian y *col* (57), la vacunación para VON en humanos no es conveniente económicamente a menos que la incidencia de la enfermedad clínica resultara más alta o el costo de la vacuna fuera menor. En caballos no se encontró información al respecto.

En cuanto al diagnóstico, en el caso de la dispersión de una enfermedad viral, Dinter (58) menciona que generalmente es vigilada por métodos serológicos tales como ELISA, pues durante las investigaciones se colecta un gran número de sueros, que por las características de la prueba pueden trabajarse rápidamente, sin embargo, dichos resultados deben verificarse.

A diferencia de otros estudios, en los cuales sólo los sueros positivos a ELISA (22, 23, 24) fueron probados por PRNT, en este estudio fueron probados todos por ambas técnicas con la finalidad de evaluar la concordancia y confirmar los diagnósticos.

Esto es apoyado por Dinter (58), ya que menciona que las técnicas de elaboración rápida y/o de nueva implementación, tales como ELISA, usualmente son comparadas con los resultados de la técnica de neutralización viral.

Lo recomendable sería realizar el aislamiento del virus en un caso clínico, hacer la secuencia del genoma viral para determinar sus cambios y comprender su comportamiento epidemiológico. El último estudio que se hizo de éste tipo fue en Argentina, donde se aisló y secuenció el virus, de esta manera, se constató que el VON está presente en Sudamérica (59).

La técnica de ELISA tiene muchas características que le permiten ser la prueba de elección para la vigilancia y seguimiento de casos de VON, entre éstas se sabe que es de elaboración rápida, los resultados del diagnóstico son obtenidos en un día y se pueden trabajar varias muestras en una misma placa; aunque se considera sensible, usualmente detecta anticuerpos unidos a diferentes epitopos virales, lo cual permite la reacción cruzada con otros flavivirus (58, 60).

Por el contrario, la técnica de PRNT es una prueba serológica con muy alta sensibilidad y especificidad ya que puede detectar hasta 50 pg de anticuerpos específicos para la neutralización viral. Esta técnica no es un procedimiento de rutina pues su gran desventaja es que se requiere de varios días para la obtención del diagnóstico, además de la asesoría de personal con experiencia técnica y especializado en el uso de cultivos celulares (58, 61). Cabe mencionar que, por utilizarse la cepa TM171 - 03 del virus debe trabajarse con un nivel 3 de bioseguridad. Debido a esto, sólo se utiliza para la confirmación de casos sospechosos.

Para el diagnóstico de los flavivirus en equinos, se recomienda hacer el diferencial con la encefalitis de San Luis como en los estudios realizados por Komar, Blitvich, Loeb y Mattar (23, 36, 38, 41) pues es enzoótica en América pero en México no se tiene este antígeno para la técnica de PRNT.

Los resultados que se obtuvieron en cuanto a la concordancia de las técnicas nos mostraron que, aunque la tasa de coincidencia no difiere mucho entre las técnicas de ELISA 1, ELISA 2 y PRNT en dilución 1:10, el valor de concordancia fue diferente.

Los valores de concordancia que se obtuvieron de la ELISA 1 fueron negativos, lo cual indica que dicha prueba tiende a discordar en sus resultados con respecto a las otras, por lo que la coincidencia se debe más al azar que al diagnóstico real; es recomendable la revisión de todo el proceso de ésta técnica desde la elaboración del antígeno y se sugiere continúe la investigación para considerarla como técnica de rutina en laboratorios con nivel de bioseguridad 2.

En lo que respecta a la ELISA 2, ésta tuvo una buena concordancia con la técnica de PRNT en dilución 1:10 por lo que se considera, es aceptable para el diagnóstico de rutina y vigilancia del VON. La concordancia con respecto a la dilución 1:100 fue pobre ya que por ser la dilución de trabajo confirmatoria para el diagnóstico, descarta las reacciones cruzadas con otras flavivirosis (61).

Por otro lado, en cuanto a la detección de anticuerpos contra la EEV y EEE, *Estrada y col* (24) también detectaron reactores pero en Veracruz y Yucatán, por lo que se considera que también debe darse seguimiento a la circulación de estos virus.

En cuanto a Salud Pública, en los casos de infección por VON, además de las manifestaciones neurológicas, raramente han llegado a ocurrir otro tipo de padecimientos como son hepatitis, pancreatitis, miocarditis, orquitis y problemas oculares (53, 62). Además se consideran como factores de riesgo padecimientos como la diabetes mellitus, hipertensión, enfermedades cardiovasculares e inmunosupresión (49, 51). En México no ha tenido el impacto esperado.

Es por esto que, según la OIE y el CDC de los Estados Unidos, se considera como enfermedad emergente en el Continente Americano (14, 42). En México hay informes de 6 casos humanos entre el 2003 y 2004, 4 de éstos en Chihuahua, uno en Nuevo León y uno en Sonora, pero ninguno fue fatal (63). De éste último se aisló el virus a partir del

suero del paciente, una mujer de 62 años con síntomas de fiebre, dolor de cabeza y vómito (47).

En este estudio se hizo notorio que en la zona de Aldama existen condiciones ideales para que se lleve a cabo la transmisión del VON y se establezca un ciclo enzoótico, por lo que las poblaciones de aves, equinos y humanos no están exentas de la presentación de la enfermedad Fiebre del Nilo. Se sugiere dar continuidad a la vigilancia a través de seguimiento en las tres especies y considerarla en los diagnósticos diferenciales ya que en Rumania, país donde se tenía conocimiento de la presencia del VON, no se consideró un problema importante hasta que en 1996 se presentó una epidemia con cerca de 400 casos donde 40 personas murieron y en 1999 el número de casos se incrementó hasta 1000 (64).

Es importante enfatizar que el control de vectores es crucial para la prevención de la infección y por tanto de la enfermedad en cualquier especie (46).

8. CONCLUSIONES

De acuerdo a la concordancia obtenida entre las técnicas utilizadas, la que se recomienda para continuar con la vigilancia de VON es la ELISA 2.

La positividad encontrada en el tamaño de muestra indica que los caballos en Aldama, Tamaulipas han estado expuestos al VON, aunque no es posible deducir si en el momento del muestreo estaban infectados. Se puede deducir que la exposición al agente en algunos animales fue reciente, ya que se detectaron anticuerpos IgM.

Existen factores de riesgo que participan de manera importante en la seroprevalencia del VON en Aldama, Tamaulipas y, aunque no se encontraron estadísticamente significativos en este estudio, se sabe que su presencia está relacionada directamente con la transmisión y permanencia de este agente.

Se recomienda aplicar los avances tecnológicos para la vigilancia utilizando los conocimientos acerca de la epidemiología de la enfermedad para de ésta manera predecir aquellas zonas de mayor riesgo y aplicar con oportunidad las medidas zoonosanitarias necesarias a fin de prevenir y controlar el número de casos.

9. LITERATURA CITADA

1. Fenner F. Virología Médica. México, D.F: Ediciones científicas La Prensa Médica Mexicana S.A. de C.V, 1993.
2. Petersen LR, Roehrig JT. West Nile Virus: a reemerging global patogen. *Emerg Infect Dis* 2002; 4:611-614.
3. Montaña H. El Virus de la Fiebre del Oeste del Nilo. *Imag Vet* 2002; 8: 7–10.
4. Romero VS, García NV, González CS, Ruiz SJ. West Nile Virus, un diferencial obligado en neurología. *Rev Mex Neuroci* 2004; 5: 137-140.
5. Secretaría de Salud. Manual para la Vigilancia, Diagnóstico, Prevención y Control del Dengue. México, Secretaría de Salud 2004. Disponible en <http://www.cenave.gob.mx>
6. McLean RG, Ubico SR, Bourne D, Komar N. West Nile Virus lin Livestock and Wildlife. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2002;267:271-307.
7. Murgue B, Zeller H, Deubel V. The ecology and epidemiology of West Nile Virus in Africa, Europe and Asia. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2002;267:195-221.
8. Saville WJ, Sofaly CD, Toribio RE. West Nile Encephalitis in Horses. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 2003;3:220-227.
9. Peterson TA, Komar N, Komar O, Navarro SA, Robins MB, Martínez ME. Priority Contribution West Nile Virus in the New World: potencial impacts on bird species. *Bird Conservation International* 2004; 14:215-232.
10. Komar N, Clark GG. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica*. 2006;19:112- 117.
11. Información sanitaria mundial de la Organización Mundial de Sanidad Animal. Disponible en [http:// www.oie.int/esp/info/hebdo/E_DSUM.htm](http://www.oie.int/esp/info/hebdo/E_DSUM.htm) enero de 2007
12. Roehrig JT, Layton M, Smith P, Campbell GL, Nasci R, Lanciotti RS. The Emergence of West Nile Virus in North America: Ecology, Epidemiology, and Surveillance. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2002;267:223-239.
13. Turell MJ, Sardelis MR, O'Guinn ML, Dohm DJ. Potential Vectors of West Nile Virus in North America. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2002;267:241-252.
14. Chevalier V., Rocque S, Baldet T, Vial L, Roger F. Epidemiological processes involved in the emergence of vector-borne diseases: West Nile fever, Rift Valley fever, Japanese encephalitis and Crimen-Congo haemorrhagic fever. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2004, 23 (2), 535-555

15. . Malkinson M, Banet C. The role of birds in the ecology of West Nile Virus in Europe and Africa. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2002;267:309-322.
16. Fernandez-Salas IF, Contreras-Cordero JF, Blitvich BJ, Gonzalez-Rojas JI, Cavazos-Alvarez A, Marlenee NL *et al* . Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Birds, Tamaulipas State, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2003;3:209-213
17. Murgue B, Murri s, Zientara S, Durand B, Durand J, Zeller H. West Nile Outbreak in horses in Southern France, 2000: The Return alter 35 years. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 2001, 7(4), 692-696.
18. Ostlund EN, Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Williams WO, Shmitt BJ. Equine West Nile Encephalitis, United States. *Emerg Infect Dis* 2002; 4:665-669.
19. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Part 2 Secc 2.10, chapter 2.10.7. http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00133.htm
20. Malkinson M, Banet C. The Role of Birds in the Ecology of West Nile Virus in Europe and Africa. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2002;267:309-321.
21. Turell M, Sardelis M, O´Guinn M, Dohm D. Potential vectors of West Nile Virus in North America. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2002;267:241-352.
22. Loroño PM, Blitvich BJ, Farfán AJ, Puerto FI, Blanco JM, Marlenee NI, et al. Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:857-9
23. 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; 9:853-6
24. Estrada JG, Navarro R, Beasley DW, Coffey L, Carrara AS, Travassos A, *et al*. West Nile Virus in Mexico: Evidence of Widespread Circulation Since July 2002. *Emerg Infect Dis* 2003; 12:1604-1607
25. Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad agroalimentaria. <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/sen/qesen/Doc1353/>
26. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. México, Secretaría de Salud. Disponible en: <http://www.cenave.gob.mx/von/>
27. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Acuerdo por el que se activa el dispositivo nacional de emergencia de sanidad animal en los términos del artículo 35 de la Ley Federal de Sanidad Animal, con el objeto de vigilar, diagnosticar, prevenir y controlar al Virus del Oeste del Nilo. 23 de junio de 2003.

28. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. Vacuna para la prevención de la enfermedad del Virus del Oeste del Nilo. México, SENASICA. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Pronabive/PEQUIVON.htm>
29. Fort Dodge Animal Health. Disponible en <http://www.fortdodgelivestock.com/equine/equine-westnile.htm>
30. Secretaría de Gobernación. Enciclopedia de los municipios de México. Los municipios de Tamaulipas. 1ª edición, 1988.
31. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Programación y presupuesto. Síntesis geográfica del Estado de Tamaulipas. México, agosto, 1983.
32. Navarro FR. Introducción a la Bioestadística, análisis de variables binarias. 1ª Ed, McGrawHill, México, 1988.
33. Medina GE. Desarrollo y estandarización de la prueba de ELISA para el diagnóstico del Virus del Oeste del Nilo (tesis de licenciatura). México (D.F.) México: Univ. Nac. Autónoma de México, 2006.
34. Pupo M, Guzmán MG, Fernández R, Llop A, Dickinson FO, Pérez D, et al. West Nile Virus in humans and horses, Cuba. *Emerg Infect Dis* 2006; 6:1022-1024.
35. Morales BM, Morales H, Blitvich BJ, Pomers AN, Davis EA, Klein R, Cordón RC. West Nile Virus in horses, Guatemala. *Emerg Infect Dis* 2006; 6:1038-1039.
36. Mattar S, Edwards E, Laguardo J, González M, Alvarez J, Komar N. West Nile Virus antibodies in Colombian horses. *Emerg Infect Dis* 2005; 9:1497 – 1498.
37. Gobierno municipal de Aldama. Disponible en <http://www.aldama.gob.mx>
38. Loeb M, Elliott SJ, Gibson B, Fearon M, Nosal R, Drebot M, et al. Protective Behavior an West Nile Virus Risk. *Emerg Infect Dis* 2005; 9:1433-1435.
39. Harwood RF, James MT. Entomología Médica y Veterinaria. México: Noriega Editores, Limusa, 1987.
40. 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; 8:1167-172.
41. Kormar O, Robbins MB, Klenk K, Blitvich BJ, Marlense NL, Burkhalter KL. West Nile Virus Transmission in residen birds, Dominican Republic. *Emerg Infect Dis* 2003; 10: 1299-1302.
42. Ramos C, Falcón LJ. La fiebre del nilo Occidental: una enfermedad emergente en México. *Salud Pública de México* 2004; 5:487-490.

43. Han LL, Popovici F, Alexander JP, Laurentia V, Tengelsen LA, Cernescu C, et al. Risk factor for West Nile Virus infection and meningoencephalitis, Romania, 1996. *The J Infect Dis* 1999; 179:230-3.
44. Brownstein JS, Rosen H, Purdy D, Miller JR, Merlino M, Mostashari F, Fish D, Spatial analysis of West Nile Virus: rapid risk assesment of an introduced vector – borne zoonosis. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2002; 2(3): 157-64.
45. Huhn GD, James J, Montgomery S, Dworkin MS. West Nile Virus in the United States: an update on an emerging infectious disease. *American Family Physician* 2003. Disponible en <http://www.aafp.org/afp/20030815/653.html>
46. Secretaría de sald. Organización Panamericana de la Salud. Entomología con énfasis en control de vectores. Vol. I. México. Publicaciones científicas No.69, 1990.
47. Quiroga DE, Todd DC, Fernández SI, Escobar LR, Valasco OD, Soto GL. West nile Virus isolation in humans and mosquitoes, México. *Emerg Infect Dis* 2005; 9:1499-1452.
48. Nash, D., F. Mostashari, A. Fine, J. Miller, D. O’Leary, K. Murray, A. Huang, A. Rosenberg, A. Greenberg, M. Sherman, S. Wong, and M. Layton. 2001. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N. Engl. J. Med.* 344(24): 1807-1814.
49. Murray K, Baraniuk S, Resnick M, Kilborn C, Cain K, Shallenberg R. Risk factors for encephalitis and death from West Nile Virus infection. *Epidemiol infect* 2006; 6: 1325-32.
50. Tsai, T.F., F. Popovici, G.L. Campbell, and N.I. Nedelcu.. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet Infect. Dis* 1998; 352: 1-5.
51. Jean CM, Honarman S, Loie JK, Glaser CA. Risk factors for West Nile Virus neuroinvasive disease, California, 2005. *Emerg Infect Dis* 2007Dec; [Epub ahead of print].
52. Granwehr, B.P., K.M. Lillibridge, S. Higgs, P.W. Mason, J.F. Aronson, G.A. Campbell, and A.D.T. Barrett. 2004. West Nile virus: where are we now? *Lancet Infect. Dis.* 4: 547-556.
53. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology and clinical manifestations of West Nile Disease. *Emerg Infect Dis* 2005; 8: 1174-1179.
54. Barrett AD, Beasley DW, Todd C, Estrada F, Navarro LJ, et al. Genome sequence and attenuating mutations in West Nile irus isolate from Mexico. *Emerg Infect Dis* 2004.
55. Fang Y, Reinsen WK. Previous infection with West Nile or ST Louis encephalitis viruses provides cross protection during reinfection in house finches. *Am J trop Med Hyg* 2006; 3: 480-485.

56. Murphy TD, Grandpre J, Novick SL, Seys SA, Harris RW, Musgrave K. West Nile Virus infection among health-care participants, Wyoming 2003: assessment of symptoms and risk factors. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 3: 246-51.
57. Zohrabian A, Hayes EB, Petersen LR. Cost-effectiveness of West Nile Virus vaccination. *Emerg Infect Dis* 2006; 3: 375-380.
58. Dinter Z. Diagnostic Virology. Food and Agriculture Organization. International Atomic Energy Agency. Swedish International Development Authority. Sweden 1989.
59. Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, García JB, Vissani A, Trono K, et al. West Nile Virus from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis* 2006 ; 12 : 1559- 1561.
60. Sánchez- Vizcaino JM, Álvarez MC. Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal. Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional de Investigaciones agrarias. Madrid. 1981.
61. Center for Veterinary Biologics and Nacional Veterinary Services Laboratorios Testing Protocol. Plaque reduction neutralization Test for detection of antibodies against West Nile Virus. 2001.
62. Koh WL, Ng ML. Molecular Mechanisms of West Nile Virus pathogenesis in Brain cells. *Emerg Infect Dis* 2005; 4: 629-632.
63. Boletín de epidemiología semana 53, 2003 Dirección general de epidemiología. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2003/sem53/pdf/cua8.pdf>. [2004 junio 7].
64. Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drovot MT. Introduction of West Nile Virus in the middle east by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* 2002; 4: 392-397.

Cuadro 1. Frecuencia de muestras obtenidas por municipio para el diagnóstico del VON en Tamaulipas, México 2006.

MUNICIPIO	No. ANIMALES MUESTREADOS Y (%)	No. UP Y (%)
ALDAMA	165 (55%)	27 (60%)
ALTAMIRA	90 (30%)	11 (25%)
GONZÁLEZ	45 (15%)	7 (15%)
TOTAL	300 (100%)	45 (100%)

UP= Unidades de producción

Cuadro 2. Finalidad de 45 Unidades de Producción (UP) en tres municipios de Tamaulipas, México 2006.

FIN DE LAS UP	No. UP Y (%)	No. ANIMALES MUESTREADOS Y (%)
ENGORDA DE BOVINOS EN PASTIZALES	42 (93%)	285 (95%)
TRASPATIO	2 (5%)	3 (1%)
CRÍA DE CABALLOS	1 (2%)	12 (4%)
TOTAL	45 (100%)	300 (100%)

UP= Unidades de producción

Cuadro 3. Tipo de depósitos naturales y artificiales de agua en 45 UP de la zona de Aldama Tamaulipas, México 2006.

TIPO DE DEPOSITOS NATURALES	FRECUENCIA EN LAS UP	
	(n=45)	
Lénticos	22	
Charcos		21
Pasto anegado		11
Lóticos	2	
Ríos		1
Arroyos		1
Ambos	2	
No tuvo	19	
TIPO DE DEPOSITOS ARTIFICIALES	FRECUENCIA EN LAS UP	
	(n=45)	
Cachivaches		17
Bebederos		27
Pozos		5
Zanjas		3
Presas		30

Cuadro 4. Resultado del diagnóstico serológico para VON por diferentes técnicas, de 300 sueros de caballo de la zona de Aldama, Tamaulipas, México 2006.

TECNICA	No. POSITIVOS DE 300 SUEROS Y SU (%)
ELISA 1	168 (56%)
ELISA 2	189 (63%)
PRNT dilución 1:10	198 (66%)
PRNT dilución 1:100	89 (30%)

ELISA 1= ELISA Indirecta para detección de anticuerpos IgG adaptada en un laboratorio con nivel 2 de bioseguridad.

ELISA 2= ELISA Indirecta para detección de anticuerpos IgG que se trabaja de rutina en un laboratorio con nivel 3 de bioseguridad.

PRNT= Técnica de neutralización por reducción de placasen dilución 1:10 y 1:100.

Cuadro 5. Concordancia entre las técnicas utilizadas para el diagnóstico serológico de Virus del Oeste del Nilo en 300 sueros de caballo de la zona de Aldama, Tamaulipas, México 2006.

TECNICAS	KAPPA	P
ELISA 1 – PRNT dil 1:10	-0.054	0.341
ELISA 1 – PRNT dil 1:100	-0.100	0.046
ELISA 2 – PRNT dil 1:10	0.716	0.00001
ELISA 2 - PRNT dil 1:100	0.349	0.00001
PRNT dil 1:10 – PRNT dil 1:100	0.357	0.00001

ELISA 1= ELISA Indirecta para detección de anticuerpos IgG adaptada en un laboratorio con nivel 2 de bioseguridad.

ELISA 2= ELISA Indirecta para detección de anticuerpos IgG que se trabaja de rutina en un laboratorio con nivel 3 de bioseguridad.

PRNT= Técnica de neutralización por reducción de placas en dilución 1:10 y 1:100.

Cuadro 6. Análisis estadístico para determinar el riesgo de las variables medidas en 300 caballos de la zona de Aldama, Tamaulipas, para diagnóstico de VON, México 2006.

VARIABLE	TOTAL (n=300)	ANIMALES POSITIVOS (%)	OR	IC	P
Sexo					
Machos	176	48 (27%)	0.76	(0.45, 1.29)	0.279
Hembras	124	41 (33%)			
Función zootécnica					
Trabajo	235	76 (32%)	1.91	(0.94, 3.94)	0.053
Cría	65	13 (20%)			
Movilización					
Si	8	2 (25%)	0.79	(0.11, 4.41)	0.769
No	292	87 (30%)			

OR= Odds ratio o razón de momios.

IC= Intervalo de confianza.

P= Significancia.

Cuadro 7. Frecuencia de edad y diagnóstico serológico para VON por la técnica de PRNT de 300 caballos muestreados en la zona de Aldama, Tamaulipas, México 2006.

EDAD (años)	POSITIVOS	TOTAL	% POS
1	0	22	0
2	0	19	0
3	0	43	23.25
4	14	25	56
5	10	22	45.45
6	10	27	37.03
7	4	14	28.57
8	17	48	35.41
9	2	6	33.33
10	17	53	32.07
11	1	2	50
12	1	9	11.11
13	1	2	50
14	0	1	0
15	1	5	20
16	1	1	100
20	0	1	0
TOTAL	89	300	-

% pos = porcentaje de positividad

Cuadro 8. Unidades de producción (UP) positivas para VON y análisis para determinar el riesgo de infección en tres municipios de Tamaulipas, México 2006.

MUNICIPIO	No. DE UP POSITIVAS (%)	OR	IC	P
Aldama	22 (81%)	1.30	(0.76,2.22)	0.3035
Altamira	9 (82%)	0.64	(0.35,1.16)	0.1159
González	6 (86%)	1.22	(0.59,2.52)	0.5591

OR= Odds ratio o razón de momios.

IC= Intervalo de confianza.

P= Significancia.

Cuadro 9. Análisis de variables basado en el total de individuos (n=300) muestreados para determinar el riesgo de infección para el VON en la zona de Aldama, Tamaulipas, México 2006.

VARIABLE	POSITIVOS (n=89)	NEGATIVOS (n=211)	OR	IC	P
Alojamiento de día	87	209	0.42	(0.04, 4.21)	0.342
Intemperie	2	2			
Alojamiento de noche	70	181	0.61	(0.31, 1.21)	0.126
Intemperie	19	30			
Vegetación predominante	1	6	0.39	(0.02,3.32)	0.333
Nativa	88	205			
Introducida					
Depósitos naturales de agua en la UP			1.85	(0.32, 0.92)	0.016
No	44	73			
Si	45	138			
Tipo de depósitos naturales					
Ríos	5	13	0.91	(0.27,2.84)	0.856
Arroyos	2	10	0.46	(0.07,2.31)	0.255
Charcos	40	11	0.74	(0.43,1.25)	0.225
Pasto anegado	23	72	0.67	(0.37,1.21)	0.159
Presencia de depósitos artificiales de agua en la UP	89	211	-	-	-
Tipo de depósitos artificiales					
Cachivaches	21	37	1.45	(0.76,2.77)	0.224
Bebederos	65	154	1.00	0.51,1.82)	0.993
Pozos	16	59	0.56	(0.29,1.09)	0.068
Zanjas	9	14	1.58	(0.60,4.09)	0.301
Presas	71	179	0.71	(0.36,1.40)	0.282
Presencia de aves silvestres	75	184	0.79	(0.37,1.68)	0.499
Presencia de aves muertas	18	40	1.08	(0.56,2.10)	0.799
Presencia de mosquitos	89	211	-	-	-

OR= Odds ratio o razón de momios.

IC= Intervalo de confianza.

P= Significancia.

Cuadro 10. Análisis de variables basado en el total de UP muestreadas (n=45) para determinar el riesgo de infección para el VON en la zona de Aldama, Tamaulipas en 2006.

VARIABLE	POSITIVOS (n=37)	NEGATIVOS (n=8)	OR	IC	P
Alojamiento de día Intemperie Caballerizas	36 1	8 0	0.00	(0.00, 89.9)	0.822
Alojamiento de noche Intemperie Caballerizas	31 6	7 1	0.74	(0.03, 8.42)	0.636
Vegetación predominante Nativa Introducida	1 36	2 6	0.08	(0.00, 1.48)	0.076
Presencia de depósitos naturales de agua en la UP	20	6	0.39	(0.05,2.64)	0.247
Tipo de depósitos naturales Ríos Arroyos Charcos Pasto anegado	2 1 17 8	1 0 4 3	0.40 - 0.85 0.46	(0.02,12.89) - (0.15,4.93) (0.07,3.12)	0.452 0.822 0.569 0.298
Presencia de depósitos artificiales de agua en la UP	37	8	-	-	-
Tipo de depósitos artificiales Cachivaches Bebederos Pozos Zanjas Presas	13 23 4 3 26	4 4 1 0 4	0.54 1.64 0.85 - 2.36	(0.09,3.19) (0.28,9.70) (0.07,23.13) - (0.40,14.40)	0.344 0.399 0.643 0.547 0.241
Presencia de aves silvestres	30	5	2.57	(0.37,17.55)	0.239
Presencia de aves muertas	8	1	1.93	(0.18,47.98)	0.488
Presencia de mosquitos	37	8	-	-	-

OR= Odds ratio o razón de momios.
IC= Intervalo de confianza.
P= Significancia.

Cuadro 11. Regresión logística de variables para determinar el riesgo de infección para el VON en la zona de Aldama, Tamaulipas, México 2006.

Variable	OR	IC	Coeficiente	D.E	Z	P
Depósitos naturales de agua	1.3725	(0.7780, 2.4214)	0.3166	0.2897	1.0931	0.2743
Función zootécnica	0.9756	(0.4443,2.1422)	-0.0248	0.4013	-0.0617	0.9508
Altitud (msnm)	1.0116	(1.0038, 1.0195)	0.0115	0.0040	2.9173	0.0035
Constante	*	*	-2.0589	0.8257	-2.4934	0.0127

OR= Odds ratio o razón de momios.

IC= Intervalo de confianza.

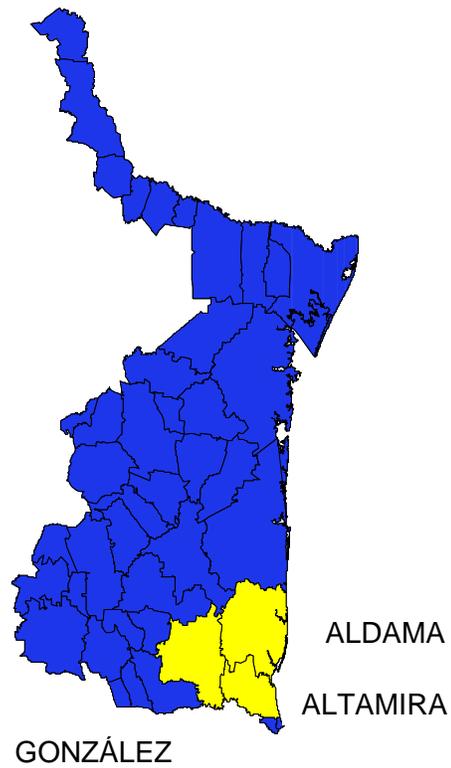
D.E = desviación estándar.

Z = Valor de Z.

P= Significancia.

ANEXO 1

MAPA DEL ÁREA DE ESTUDIO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA
EL VIRUS DEL OESTE DEL NILO (ESTADO DE TAMAULIPAS, MEXICO)



ANEXO 2

CUESTIONARIO PARA EL MUESTREO SEROLÓGICO DE CABALLOS E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO PARA EL VIRUS DEL OESTE DEL NILO MUESTREO SEROLÓGICO DE CABALLOS

No. de Registro _____

Fecha: _____

Sr. Productor, los datos que a continuación le solicitamos serán analizados en conjunto y no individualmente, garantizando así su confidencialidad.

I. DATOS DE LA EXPLOTACIÓN O UNIDAD PRODUCTIVA:

1. Nombre de la explotación o UP: _____

2. Ubicación: _____

Calle	Número	Colonia o Localidad
Coordenadas: lat _____ long _____ altitud _____		
Municipio	Entidad	Número de teléfono

3. Nombre del entrevistado: (dueño o encargado) _____

4. Principal especie animal en la explotación: _____

5. Dónde se alojan los animales durante el día?: caballerizas () intemperie () otro ()

6. Dónde se alojan los animales durante la noche?: caballerizas () intemperie () otro ()

7. Durante el 2005 y 2006 tuvo casos en los que sus caballos presentaron:

Falla en sus movimientos al caminar o comer? (si) (no) Movimientos masticatorios?: (si) (no)

Mucho sueño durante el día? (si) (no) Labios colgados (si) (no) Caminata en círculos? (si) (no)

Otros _____

8. Qué animales se afectaron más? Jóvenes () viejos () adultos () de cualquier edad ()

9. Cuál es la vegetación predominante dentro del rancho? Natural o nativa () Modificada o introducida ()

10. Hay depósitos de agua naturales dentro de la UP? (si) (no) (si la respuesta es NO, pasar a No. 12)

11. Cuáles son los depósitos de agua naturales dentro de la UP:

Lóticos (ríos, arroyos) (si)(no) Especifique _____ Lenticos (charcos, pasto anegado)(si)(no) Especifique _____

12. Hay depósitos de agua naturales fuera de la UP a menos de 500 m: (si) (no) Especifique _____

13. Hay depósitos de agua artificiales dentro de la UP: (si) (no), Cuáles? Cachivaches (si) (no) bebederos (si)(no); pozos, letrinas y cisternas abiertas (si) (no); jagueyes o zanjas (si) (no)

14. Hay depósitos de agua artificiales fuera de la UP a menos de 500 m: (si) (no) Especifique _____

15. Llegan aves silvestres o migratorias dentro de la UP? (si) (no) Dónde? _____; y fuera a menos de 1 km? (si) (no)

16. Ha encontrado aves muertas dentro de la UP de enero de 2005 a la fecha? (si) (no)

17. En esta época hay muchos mosquitos por aquí? (si) (no)

II. DATOS DE LOS CABALLOS MUESTREADOS:

No	Id animal	Sexo H M	Edad meses	Func zotec *	Movilizado? (si) (no)	Cuando? dd/mm/aa	A donde? **	Vacuna (si)(no)	Fecha ultima Vac.

* (1) trabajo (2) cria (3) deporte (4) turismo

** (1) mismo municipio (2) otro municipio (3) otro Estado (4) otro país

ANEXO 3

INSTRUCTIVO DEL CUESTIONARIO PARA EL MUESTREO SEROLÓGICO DE CABALLOS E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO PARA EL VIRUS DEL OESTE DEL NILO

Escribir claramente y con letra de molde.

Llenar un cuestionario por cada Unidad de Producción (UP) o ejido en el que sean muestreados caballos.

El número de registro será consecutivo iniciando en 1 (uno).

Escribir la fecha en que se realice el muestreo de los animales y el levantamiento de información.

I. DATOS DE LA EXPLOTACIÓN O UNIDAD PRODUCTIVA:

1. Escribir el nombre de la UP o ejido donde se muestrearon los animales.
2. Escribir la ubicación con el nombre de la calle, número oficial, colonia o localidad, municipio y entidad, número de teléfono y coordenadas geográficas, según la lectura del SPG.
3. Escribir el nombre de la persona que proporcione los datos para el llenado del cuestionario.
4. Escribir la principal especie animal que se críe o a la que se dedique la explotación.
5. Marcar sólo una opción, según sea el caso.
6. Marcar sólo una opción, según sea el caso.
7. Marcar una o más opciones, es decir, las que sean necesarias y de faltar la adecuada, escribirla en el espacio.
8. Marcar sólo una opción.
9. Marcar sólo una opción, natural cuando las áreas verdes de la explotación en su mayoría se trate de plantas que crecen sin ningún fin específico. Modificada cuando se trate de cualquier especie de planta cultivada con un fin específico, por ejemplo, como fuente de alimento para el ganado.
10. Marcar sólo una opción, en caso negativo continuar con la pregunta no. 12.
11. Marcar lóxicos cuando en la explotación se encuentren cuerpos de agua con movimiento propio como ríos y arroyos. Marcar lénticos en caso de que los cuerpos de agua no tengan movimiento propio, como el caso de charcos, áreas de pastoreo anegadas, lagunas y lagos, entre otros y especificar.
12. Marcar sólo una opción y especificar el tipo.
13. Elegir si o no y marcar una o varias de las opciones según sea el caso, considerando como cachivaches todo aquel objeto de cualquier tamaño en el que pueda acumularse agua como son llantas, macetas, tambos, cubetas, entre otros.
14. Marcar sólo una opción, según sea el caso y especificar.
15. Marcar sólo una opción, según sea el caso y de ser afirmativo especificar el lugar de arribo.
16. Marcar sólo una opción.
17. Marcar sólo una opción.

II. DATOS DE LOS CABALLOS MUESTREADOS:

No. – Anote el número consecutivo de la muestra tomada en esa explotación.

ID animal – Escriba la identificación del caballo (nombre o número).

Sexo – registre H en caso de ser hembra o M en caso de ser macho.

Edad – Escriba meses la edad del caballo muestreado.

Función zootécnica – Registre para qué utilizan al animal muestreado en la explotación usando sólo una de las cuatro opciones: 1. trabajo, 2. cría, 3. deportes, 4. turismo.

Ha sido movilizado? – Escribir si ó no, según sea el caso. En caso afirmativo continuar con las siguientes dos preguntas.

Cuando? – Escribir la fecha de la última vez que fue movilizado el caballo.

A dónde? Escribir del 1 al 4, según corresponda.

Vacuna contra VON? – Escribir si o no, si el caballo ha sido o no vacunado.

Fecha última de vacunación - Escribir la fecha de la última vez que fue vacunado el caballo.

ANEXO 4

PROCEDIMIENTO PARA LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS DEL OESTE DEL NILO ADAPTADA EN UN LABORATORIO CON NIVEL 2 DE BIOSEGURIDAD

- 1) Preparar dilución del antígeno 1:1000 con PBS y colocar 100 µl en cada pozo de la placa. Incubar a 4°C mínimo 18 hrs.
- 2) Eliminar el antígeno no adsorbido y lavar 3 veces todos los pozos con 200 µl de *solución de lavado*.
- 3) Bloquear con 200 µl cada pozo con *amortiguador para bloqueo* e incubar 1 hora a 37°C.
- 4) Hacer diluciones 1:200 por cada suero en *amortiguador para bloqueo*, incluyendo los sueros testigos. Por placa se pueden trabajar hasta 40 sueros problema.
- 5) Lavar 3 veces la placa con 200 µl de *solución de lavado*.
- 6) Colocar 50 µl en cada pozo de las diluciones de suero una vez agitadas en el vortex, utilizando para el testigo de conjugado, únicamente PBS.
- 7) Tapar e incubar 1 hora a 37°C utilizando el agitador de placas.
- 8) Diez minutos antes de terminar la incubación, preparar la dilución del *conjugado anti-IgG* de caballo marcado con peroxidasa en PBS.
- 9) Terminada la incubación de la placa con los sueros, tirar y lavar 4 veces.
- 10) Colocar el conjugado en dilución 1:3000 en un volumen de 50 µl por pozo.
- 11) Tapar e incubar 1 hora a 37°C utilizando el agitador de placas. A su vez, incubar 100 ml de agua desionizada estéril.
- 12) Retirar de la incubadora el agua desionizada 10 min antes de terminar la incubación de la placa y disolver en ésta una cápsula de *buffer fosfato-citrato*. Pasar 10 ml del buffer a un frasco ámbar y disolver una tableta del cromógeno TMB para formar la solución de cromógeno..
- 13) Terminada la incubación de la placa, tirar el contenido y lavar 4 veces.
- 14) Colocar 95 µl de la *solución de cromógeno* en cada pozo.
- 15) Incubar 10 minutos a 37°C con el agitador de placas.
- 16) Detener la reacción enzimática con 95 µl de *solución de paro* en cada pozo.
- 17) Leer la Densidad Optica (DO) con un filtro de 450 nm en el lector automático de ELISA con el programa de cómputo adaptado para el diagnóstico de VON (33).

ANEXO 5

ESQUEMA DE LA POSICIÓN DE SUEROS EN LA PLACA PARA LA TECNICA DE ELISA-I PARA DIAGNOSTICO DE VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN UN LABORATORIO DE NIVEL 2

sueros testigo muestras de suero en duplicado

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C.C	C.C	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
B	C.C	C.C	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
C	C++	C++	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
D	C++	C++	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
E	C+	C+	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
F	C+	C+	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
G	C-	C-	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
H	C-	C-	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40

- C.C testigo de conjugado
- C++ suero testigo fuerte positivo
- C+ suero testigo débil positivo
- C- suero testigo negativo

ANEXO 6

LISTA DE REACTIVOS PARA LA TECNICA DE ELISA – I PARA EL DIAGNOSTICO DE VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN UN LABORATORIO DE NIVEL 2

Amortiguador de fosfatos (PBS pH=7.4, 0.01M):

Disolver en un matraz aforado con un litro de agua desionizada estéril las siguientes sustancias:

Fosfato de sodio	1.21 g/l
Fosfato de Potasio	0.20 g/l
Cloruro de sodio	8 g/l
Cloruro de Potasio	0.20 g/l

Solución de lavado:

Para este amortiguador se requiere de 1 litro de PBS y 1 ml de Tween 20 al 0.1%.

Amortiguador para bloqueo, dilución de sueros y conjugado:

Se prepara mezclando en un vaso de precipitado 5 g de leche descremada en 100 ml de PBS.

Amortiguador de citratos con perborato de sodio, pH 5.0 ± 0.05

Disolver una cápsula de amortiguador de citratos (0.05 M Fosfato-Citrato, 0.03% Perborato de Na) en 100 ml de agua desionizada incubada previamente a 37°C y agitar enérgicamente. Es importante prepararlo 15 minutos antes de su utilización.

Cromógeno 3,3',5,5' Tetrametilbencidina dihidrocloruro:

Para cada placa de ELISA, colocar 10 ml de amortiguador de citratos con perborato de sodio en un frasco ámbar y disolver una tableta de TMB (1 mg) agitando ligeramente. Preparar inmediatamente antes de su utilización.

Solución de paro:

Adicionar lentamente 105 ml de ácido sulfúrico 2 M a 895 ml de agua desionizada y mantener a temperatura ambiente.

ANEXO 7

ESQUEMA DE LA POSICIÓN DE SUEROS EN LA PLACA PARA LA TECNICA DE
ELISA-I PARA DIAGNOSTICO DE VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN UN
LABORATORIO DE NIVEL 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CC	CC	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
B	CC	CC	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
C	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11
D	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11
E	12	12	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17
F	12	12	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17
G	18	18	19	19	20	20	21	21	CP	CP	CN	CN
H	18	18	19	19	20	20	21	21	CP	CP	CN	CN

Filas A, C, E y G con antígeno negativo

Filas B, D, F y H con antígeno positivo

CC Testigo de conjugado

CP suero testigo positivo

CN suero testigo negativo

ANEXO 8

DISTRIBUCIÓN DE LAS UP MUESTREADAS PARA OBTENCIÓN DE PREVALENCIA E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO PARA VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN TRES MUNICIPIOS DE TAMAULIPAS, MÉXICO.



ANEXO 9

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE UP CON CABALLOS POSITIVOS A LA SEROLOGÍA PARA VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN RELACIÓN A LA ALTITUD EN TAMAULIPAS, MÉXICO.

