

# La presencia de aves migratorias podría reducir la transmisión de Virus del Oeste del Nilo en Guatemala.

María Eugenia Morales,  
Nicholas Komar,  
Luis Eduardo Martínez,  
Jean-Luc Betoulle,  
Danilo Alvarez,  
Nicholas Panella,  
Carmen Lucía Contreras,  
Celia Cerdón-Rosales.

## Resumen

Para evaluar la transmisión del VON en Guatemala, se realizó una encuesta serológica preliminar en aves residentes, silvestres y domésticas, del Departamento de Izabal. Se eligió tres sitios de muestreo que diferían, según observaciones preliminares, en términos del porcentaje de aves migratorias presentes. Los sitios se definieron como AREA BOSCOSA (AB), AREA RURAL (AR), y AREA URBANA (AU). La seropositividad a VON se determinó mediante el ensayo de ELISA de bloqueo. Aplicando las metodologías de conteo de aves capturadas en red y censos se determinó el porcentaje de aves migratorias versus residentes. Se determinó inicialmente que las aves migratorias representan el 31.4% (AB), 26.2% (AR) y 18.8% (AU) de la totalidad de aves contabilizadas y que la seropositividad de VON en las aves

## Abstract

To investigate West Nile Virus transmission in Guatemala, we started an ecological study on wild and domestic birds in order to assess the possible relationship between the amount of migratory birds and seropositive reports of resident birds. We conducted a field study in the Caribbean Coast (Izabal) of Guatemala in three study sites where differences in terms of migratory bird presence were previously reported. The study sites were defined as “Area Boscosa = Wooden Area” (AB); “Area Rural = Rural Area” (AR) and “Area Urbana = Urban Area” (AU). Seropositive birds were identified using a Blocking ELISA test. We determined the percentages of migratory (versus resident) birds based on the number of birds captured in mist nets or bird counts. Our initial results demonstrate that migratory birds represented: 31.4% (AB), 26.2% (AR) and 18.8% (AU)

residentes varió inversamente siendo 7% (AB), 18.4% (AR) y 28.3% (AU) respectivamente. Estas observaciones permitieron esbozar un análisis preliminar de la ecología del VON en la región del caribe guatemalteco. La evidencia serológica hallada indica la existencia de una débil correlación inversa entre la seropositividad de VON en aves residentes y la abundancia relativa de aves migratorias.

and that seroprevalence among resident birds varied inversely: 7.0% (AB), 18.4 % (AR) and 28.3 % (AU) in 2005.

Our preliminary data suggest a weak inverse relationship between migratory bird abundance (relative to resident birds) and local WNV transmission.

## Introducción

Desde su aparición en la región de Nueva York, U.S.A. en 1999, el Virus del Oeste del Nilo (VON) se ha esparcido a través del continente americano. Es comúnmente aceptado que las aves migratorias pueden servir como vehículo para la introducción de VON en nuevas zonas geográficas (1). Se reconoce a la región caribe de Guatemala como un punto importante en la ruta de migración de las aves neárticas, especialmente el Departamento de Izabal (2). En América latina se ha reportado varias especies de aves positivas para VON en pruebas serológicas por lo que se ha postulado a esas especies como posibles reservorios naturales (3). En 2003, Komar *et al.*, reportaron cinco especies de passerinos como hospederos competentes, en laboratorio, del VON: *Cyanocitta cristata*, *Quiscalus quiscula*, *Carpodacus mexicanus*, *Corvus brachyrhynchos* y *Passer domesticus*. Sin embargo los reservorios aviares naturales del virus se desconocen aún.

En Guatemala, existe evidencia serológica de la circulación de VON en caballos de diferentes departamentos del país desde 2003 (4). Para generar datos iniciales que nos permitan comprender mejor la ecología del VON en condiciones neotropicales, realizamos un monitoreo de aves residentes y migratorias. Así mismo estimamos la seropositividad para VON en la población de aves residentes, durante 2005. Con los resultados de este trabajo de investigación se pretende evaluar la posibilidad que, debido a su naturaleza transitoria, la presencia de aves migratorias en Izabal, interfiera con la infección a VON de las aves locales. Se postula la idea que, al menos en la época estudiada, un número elevado de aves migratorias podría disminuir el nivel de infección en las aves residentes.

## Métodos

- Sitios de trabajo

a) Punta de Manabique (Área Boscosa): el punto de trabajo se halla a una longitud N 15° 30.049', latitud W 88° 49.591' y 5 m de altitud en el Refugio de Vida Silvestre Punta de Manabique. Se define como un área límite entre los hábitats de duna, y plantación de árboles frutales, cuya sombra permite la retención de la avifauna del bosque original. Además, esta plantación constituye un cerco vivo, entre la zona habitada y el bosque tropical cenagoso y manglar. Según un estudio de la Fundación Mario Dary (FUNDARY), el sitio registra una densidad elevada de aves migratorias.

b) Machacas del mar (Área Rural): el punto de trabajo se halla a una longitud W 88° 32.157', latitud N 15° 45.772' y 9m de altitud; es un área rural ganadera. La vegetación es predominantemente crecimiento secundario y árboles frutales. Respecto a Punta de Manabique la densidad de aves migratorias registradas es menor.

c) Ciudad de Puerto Barrios (Área Urbana): el punto de trabajo se halla a una longitud W 88° 35.764', latitud N 15° 43.512' y 12m de altitud. Área verde cercada. Constituida principalmente por árboles frutales crecimiento secundario de arbustos, y drenajes expuestos. Respecto a Punta de Manabique y Machacas del Mar, es el sitio con la menor densidad de aves migratorias registradas.

- Época de trabajo

Se trabajó durante el año de 2005, realizando cuatro muestreos en meses que corresponden a distintas épocas de migración de las aves neárticas: enero (invernal), marzo (pre-nupcial), junio (estival) y agosto (post-nupcial).

- Captura, manejo y toma de muestras de aves silvestres y domésticas

Previo a la captura de las aves silvestres se obtuvo una licencia de investigación otorgada por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). Con el fin de capturar aves paseriformes, se empleó redes de niebla cubriendo entre 175m a 205m dependiendo de la accesibilidad geográfica y seguridad en cada sitio. Las redes se abrieron, durante dos días por sitio, desde el amanecer hasta las 11:00 AM como máximo. Se revisó las redes cada 15-20 minutos y se colocó a las aves capturadas en bolsas previstas para el efecto. Todas las aves fueron identificadas y se tomó sus datos morfométricos, determinando su edad y sexo cuando era posible. Las aves migratorias y las residentes, incluidas en el listado CITES o muy pequeñas para ser muestreadas fueron anilladas y luego liberadas. Las demás aves silvestres residentes fueron anilladas y luego muestreadas tomando un volumen de sangre equivalente al 1% del peso corporal obtenido con agujas de 1cc a partir de la vena yugular o de la vena radial. Las aves domésticas, generalmente gallinas, fueron muestreadas de manera similar. Todas las muestras se colectaron en microtubos con gel separador de suero. Se dejó reposar la

muestra por 30 min, luego se centrifugó según instrucciones del proveedor y se transportaron en frío a los laboratorios del CES-UVG-CDC-CAP. Se colocó las muestras a -20°C previo al análisis serológico.

- Determinación del porcentaje de aves migratorias en cada sitio.

Se empleó dos metodologías de conteo. El método de conteo en redes se basó en la contabilización de las aves silvestres residentes y migratorias capturadas. El método de conteo por “censo” se realizó por medio de transectos de observación. Los ornitólogos del proyecto contabilizaron las aves (vistas y escuchadas) en cinco transectos correspondientes a distintos microhábitats para cada uno de los sitios de trabajo. Los conteos se realizaron entre las 6:00 y 9:00 a.m., por 30 minutos en cada transecto.

- Determinación de la seropositividad para VON en aves.

Un total de 712 muestras de suero de aves se analizó mediante el ensayo de ELISA de bloqueo (B-ELISA) (5). Se realizó el tamizaje de las muestras empleando los anticuerpos monoclonales 6B6C-1 que tienen una reactividad general para *Flavivirus* y 3.1112G que es específico para VON. El B-ELISA permitió determinar la seropositividad a VON en las aves residentes domésticas y silvestres provenientes de los diferentes sitios de muestreo.

- Confirmación de resultados serológicos.

Un subgrupo de 63 muestras incluyendo todas las positivas y algunas negativas se envió a los Centros de Prevención y Control de Enfermedades, CDC, (Fort Collins, Colorado, Estados Unidos) para confirmar los resultados del ELISA de bloqueo mediante la prueba estándar de oro Prueba de Reducción y Neutralización de la formación de Placas (PRNT, por sus siglas en inglés).

- Análisis estadístico.

Debido al uso de pruebas paramétricas para el análisis de los datos se normalizó los porcentajes de seropositividad para VON determinados por ELISA de bloqueo, para cada sitio, durante los cuatro muestreos. También se normalizó la razón de aves migratorias a residentes para cada sitio, en cada época de migración, según las dos metodologías empleadas. Los datos se normalizaron con la transformada de arcoseno.

Se determinó si las diferencias observadas en términos de abundancia relativa de aves migratorias eran significativas, entre cada sitio, en cada época de muestreo. Para ello se aplicó una prueba de ANOVA de dos factores sin repetición, a los datos recabados mediante las dos metodologías de conteo.

Se llevó a cabo un análisis de correlación entre la abundancia relativa de aves migratorias y la seropositividad para VON. Para ello se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

## Resultados

### Determinación de la abundancia relativa de aves migratorias.

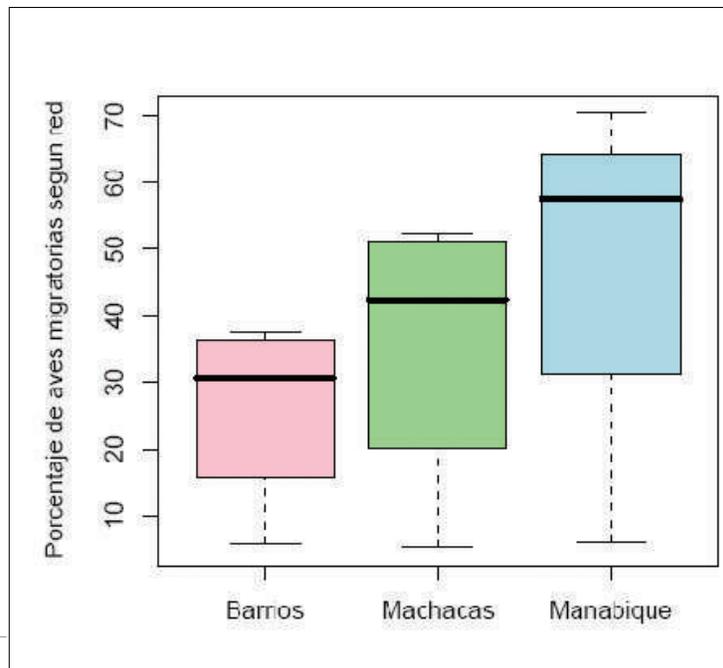
El estimado de la abundancia relativa de aves migratorias en cada sitio de muestreo, durante el periodo de migración correspondiente al año 2005 obtenido por medio del conteo de capturas en redes neblineras se presenta en la Figura 1. El estimado obtenido por medio del conteo de aves en transectos en la Figura 2.

Los recuentos de la primera figura fueron mayores para todos los casos y en ambas figuras el mayor recuento se encontró en Manabique. Ambas figuras de caja muestran la diferencia encontrada en el valor de la mediana para los tres sitios, la cual fue evidente. La distribución de los datos fue más simétrica en los sitios Barrios y Machacas de la Figura 2. En ningún

caso se detectaron puntos extremos en la distribución.

En el Cuadro 1 se muestra el número de aves migratorias y residentes determinados según las dos metodologías de conteo, para los tres sitios estudiados y en cuatro meses distintos. En la última columna de ambos cuadrados se encuentra el valor del porcentaje de aves migratorias con respecto al total de aves. El porcentaje ha sido transformado algebraicamente como se especificó en la sección de análisis estadístico. El análisis de variancia de estos datos, según conteo de capturas en redes neblineras, indicó que las diferencias encontradas en los tres sitios eran significativas, independientemente del mes en donde se efectuó el recuento. El mismo análisis de los datos transformados para el conteo en transectos indicó una diferencia significativa según el mes del recuento, pero una diferencia poco significativa entre los lugares.

Fig. 1. Variación del porcentaje de aves migratorias por sitio según conteo de capturas en redes neblineras.



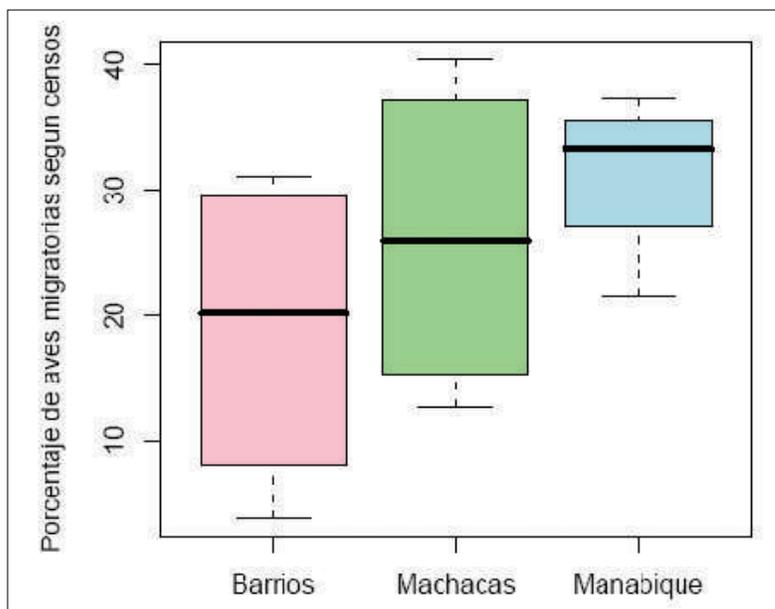


Fig. 2. Variación del porcentaje de aves migratorias por sitio según método de conteo (censos) en transectos.

**A**

Mes	Sitio	# Aves capturadas en red		% transformado
		migratorias	residentes	
Enero	Manabique	27	10	58.3
	Machacas	24	17	49.8
	P. Barrios	10	44	25.9
Abril	Manabique	31	13	56.8
	Machacas	15	31	35.1
	P. Barrios	14	28	35.5
Junio	Manabique	0	23	5.89
	Machacas	0	30	5.17
	P. Barrios	0	25	5.65
Agosto	Manabique	35	4	70.4
	Machacas	2	1	52.5
	P. Barrios	1	2	37.5

Cuadro 1. Porcentaje normalizado de aves migratorias. A. Contabilización en red.

**B**

Mes	Sitio	# Aves observadas		% transformado
		migratorias	residentes	
Enero	Manabique	6	41	21.6
	Machacas	2	48	12.7
	P. Barrios	0	55	3.8
Abril	Manabique	10	23	33.8
	Machacas	36	50	40.4
	P. Barrios	21	59	31.0
Junio	Manabique	16	28	37.3
	Machacas	4	43	17.8
	P. Barrios	2	51	12.4
Agosto	Manabique	18	44	32.8
	Machacas	24	53	34.1
	P. Barrios	14	51	28.0

B. Aves observadas durante los censos, durante 2005.

Mediante ambas metodologías se estimó, que de un total de 1086 aves incluidas en el estudio poblacional, las aves migratorias representaron en promedio el 31.4%, 26.2% y 18.8 % para el área boscosa (Punta de Manabique), área rural (Machacas del Mar) y área urbana (Puerto Barrios) respectivamente. Para determinar estos porcentajes se promedió el porcentaje de aves migratorias por sitio independientemente de la época del año.

### Seropositividad para VON en aves residentes.

Se procesó un total de 712 muestras de suero de aves domesticas y silvestres. Para obtener datos más significativos de seropositividad, se contabilizó como un solo grupo, a las aves residentes silvestres y domésticas. El ensayo de ELISA de bloqueo indicó que la

seropositividad en 2005, en la población muestreada fue de 7%, 18.4% y 28.3% para área boscosa, área rural y área urbana, respectivamente (Figura 3).

La confirmación de los resultados del ensayo de ELISA de bloqueo, mediante la prueba de PRNT (resultados no mostrados) permitió validar la aplicación de la prueba de B-ELISA para realizar el tamizaje de muestras. Se estableció que el ensayo de ELISA de bloqueo generó resultados con un 100% de sensibilidad y 85.71% de especificidad para las condiciones del laboratorio.

De los individuos confirmados como positivos en aves silvestres sobresalen cuatro especies: las gallinas (*Gallus gallus*) y las aves silvestres comúnmente conocidas como cenizotes (*Turdus grayi*), zanates (*Quiscalus mexicanus*), y palomitas (*Leptotila cassini*) (resultados no mostrados).

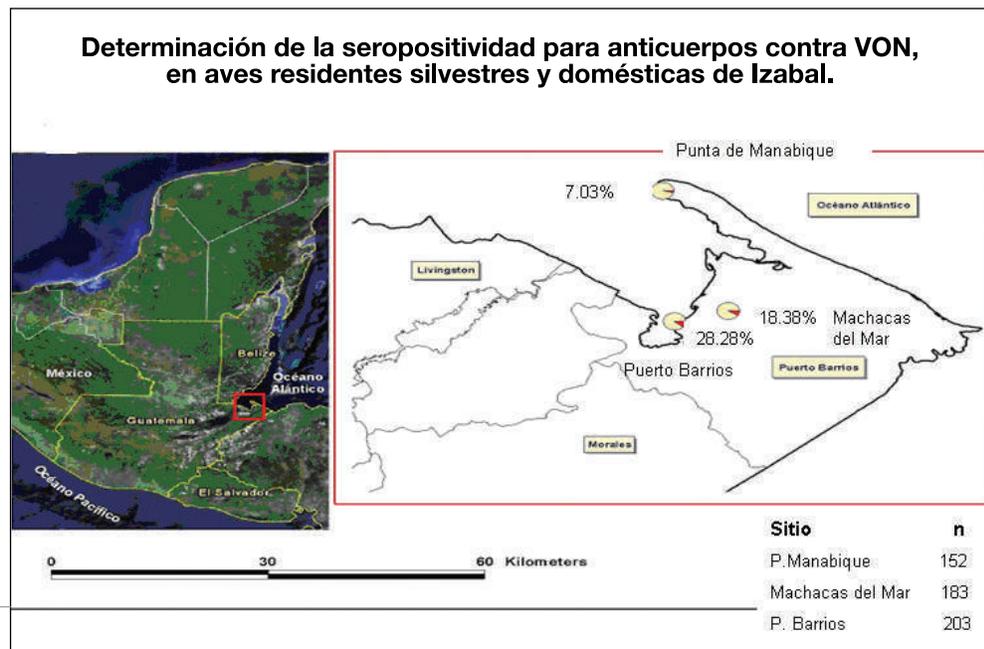


Figura 3. Mapa de los sitios de muestreo con la seropositividad correspondiente a cada uno: área boscosa (Punta de Manabique), área rural (Machacas del Mar) y área urbana (Puerto Barrios).

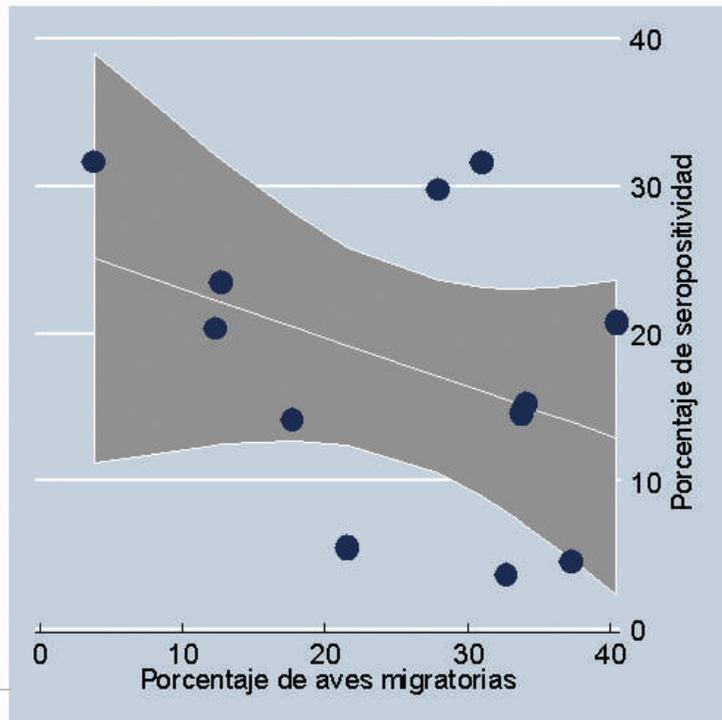
**Correlación entre la seropositividad a VON en aves residentes y la abundancia relativa de aves migratorias.**

Se determinó la correlación entre el porcentaje transformado de aves migratorias (empleado como un índice de abundancia relativa) y la seropositividad determinada a lo largo del estudio en el Departamento de Izabal. Debido a los posibles sesgos en las cifras obtenidas de los recuentos por captura en redes (ver Discusión), la metodología de transectos se consideró

como más representativa de la población aviar del área en que se trabajó, por lo que únicamente se emplearon estos datos para el análisis.

No se observó una diferencia significativa entre la abundancia relativa de aves migratorias y la seropositividad a VON en la población residente de región caribe de Izabal. Sin embargo, como se muestra en la Figura 4, existe una tendencia débil a observar mayor seropositividad en donde hay menos aves migratorias ( $p= 0.2233$ ). El coeficiente de correlación de Pearson fue:  $r = 0.7830 < -0.3797 < 0.2482$ .

Fig 4. Correlación entre la abundancia de aves migratorias determinado por censos y la seropositividad (la región gris indica la banda al 95 % de incertidumbre en los parámetros).



## Discusión

Desde su aparición en el continente americano, el VON se ha constituido en una amenaza para la salud pública y veterinaria. En la región latinoamericana aún se desconocen muchos aspectos de la ecología del virus como por ejemplo: su vía de introducción, posibles hospederos reservorios y amplificadores, y posibles vectores involucrados en su ciclo de transmisión. En regiones neotropicales se considera la posibilidad de que el ciclo de transmisión sea ininterrumpido. Se ha postulado la hipótesis de que el VON ha seguido un patrón de dispersión basado en las rutas de migración de las aves, a lo largo de América. Por ello, la región caribe de Guatemala, conocida por albergar aves migratorias, se consideró un punto ideal para monitorear preliminarmente la actividad de VON. Específicamente se buscaban indicios serológicos de la presencia del virus en las aves residentes de la zona, intentando aportar elementos para comprender la ecología del mismo, así como obtener evidencia de que el VON ha establecido un ciclo de transmisión en Guatemala.

Para poder evaluar la hipotética correlación entre la naturaleza transitoria de las aves migratorias (reservorios naturales) y el establecimiento de un ciclo infectivo de VON en un foco de transmisión, se estimó el porcentaje de aves migratorias presentes en tres diferentes sitios de estudio. Con el fin de evaluar el porcentaje de aves migratorias, se emplearon dos metodologías de conteo. Los datos obtenidos mostraron que se logró comprobar la existencia de diferencias significativas en la proporción de aves

migratorias a residentes, entre cada sitio de estudio en el año 2005, (Cuadro 1, Figuras 1 y 2). Con ambas metodologías se observó una tendencia a que el hábitat boscoso, menos degradado, tuviera más aves migratorias que los otros dos hábitats (por definición más degradados) que correspondían a una área rural y una área urbana. A pesar de que las dos metodologías muestran resultados similares, se considera que el conteo por captura en redes neblineras presenta varios inconvenientes. Por ejemplo, solo las aves de sotobosque o aves que vuelan relativamente bajo pueden ser capturadas en las redes. Por lo tanto aunque se sabe que la metodología de conteo en transectos tiene también posibles sesgos, se consideró a los resultados obtenidos mediante este método como el más representativo de la población aviar de cada sitio.

Los resultados que se obtuvieron por ELISA de bloqueo indicaron que existía evidencia serológica de la posible circulación de VON en aves residentes del Departamento de Izabal. La especie con mayor cantidad de casos positivos fueron las gallinas, *Gallus gallus* que pueden considerarse como una población centinela. Es importante resaltar que de las aves silvestres positivas para VON, dos de las especies (*Quiscalus mexicanus* y *Turdus grayi*) pertenecen a géneros para los cuales se ha reportado previamente su posible importancia como reservorios amplificadores en Estados Unidos (1,7). La especie silvestre más capturada durante este trabajo fue precisamente *T. grayi*, por lo que a futuro podría considerársele como una especie blanco para monitorear la actividad del virus.

Es posible que la presencia abundante de aves migratorias en un sitio de introducción del VON, evite el establecimiento de su ciclo infectivo en la población aviar local. Su presencia reduciría la posibilidad de que zancudos vectores, así como posibles hospederos residentes, adquiriesen la infección en el foco de transmisión, debido a que las aves portadoras del virus son de naturaleza transitoria. La dinámica de transmisión en ese caso indicaría que

el VON se diluiría en un ciclo de transmisión entre las mismas aves migratorias, dificultando el establecimiento de una zoonosis local. El análisis de correlación indicó que existía una débil tendencia a una relación inversa, estadísticamente no significativa ( $p=0.2233$ ), entre los parámetros evaluados. Es necesario obtener más datos para lograr corroborar la hipótesis anterior.

---

## Conclusión

Las observaciones experimentales obtenidas demuestran que existe evidencia serológica de la circulación de VON en aves residentes de la costa Atlántica del país. Sin embargo no puede confirmarse la presencia del virus hasta obtener un aislado viral. Esto es imperativo debido a la posible presencia de otros Flavivirus (que podrían generar falsos positivos en los ensayos serológicos) circulando en el mismo nicho ecológico, como por ejemplo el Virus de Encefalitis de San Luis (SLEV por sus siglas en inglés) que ya fue aislado a partir de zancudos infectados en Guatemala (8). Aunque en principio el B-ELISA permite distinguir entre VON y SLEV y que el PRNT confirma la infección por VON, no se puede excluir al 100% la posibilidad de que variantes de estos virus circulen y provoquen reacciones cruzadas en serología.

Para que el VON establezca un ciclo enzoótico en una población de aves residentes se requiere de la presencia de vectores competentes y hospederos amplificadores. Especies del mismo género que *Q. mexicanus* y *T. grayi* se han descrito en Estados Unidos como posibles hospederos competentes de VON (1,7). Es importante seguir estudiando en el tiempo la seropositividad a VON en las especies de aves residentes a fin de confirmar el establecimiento y dinámica de vida de VON en aves de Guatemala. Así mismo

es importante realizar estudios en los posibles vectores con el fin de aislar los virus que circulan en las poblaciones locales e identificar la preferencia de alimentación de los posibles vectores. Nuestro equipo de investigación continúa trabajando en estos temas.

## Agradecimientos

Agradecemos al personal de DVBID CDC Fort Collins: Dra Ann Powers, Susan Beckett y Eric Edwards por su colaboración en el trabajo de investigación, al personal de CES-UVG/CDC-CAP, Juan García, Aquiles García, Luis López, y José Roberto Ramírez, por su participación directa en el trabajo de campo, procesamiento de las muestras y análisis de resultados; al personal de la Fundación Mario Dary, Dugglio López y otros guarda recursos por su participación en las giras de campo, captura de aves y colecta de muestras; al Lic. Fredy Mejía por su asesoría en la elaboración del análisis estadístico. Agradecemos al M.Sc. Carlos Rolz por la lectura crítica y aporte a este artículo.

Este proyecto fue financiado en parte con fondos del acuerdo cooperativo entre CDC-CAP y la Universidad del Valle de Guatemala así como con fondos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Guatemala (CONCYT), proyecto FD 19-03.

## Bibliografía

1. Komar, N., Langevin, S., Pinten, N., Nemeth, E., Edwards, E., Hettler, D., Davies, B., Bowen, R. & Bunning, M. *Experimental infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus* Emerg. Infect. Dis. 9: 311-22, 2003
2. FUNDARY-ONCA (Comps). Plan Maestro del Área de Protección Especial Punta de Manabique (versión ejecutiva). Consejo Nacional de Areas Protegidas, Fundación Mario Dary Rivera. Guatemala, 2001.
3. Komar, N. & Clark, G.G. *West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean* Rev. Panam. Salud Pública Feb;19 (2): 112-7, 2006
4. Morales-Betoulle, M.E., Morales, H., Blitvich, B.J., Powers, A.M., Davis, E.A., Klein, R. & Cordon-Rosales, C. *West Nile virus in horses, Guatemala* Emerg. Infect. Dis. 12 (6): 1038-9, 2006
5. Blitvich, B., Marlene, N., Hall, R., Calisher, C., Bowen, R., Roehrig, J., Komar, N., Langevin, S. & Beaty, B. *Epitope-Blocking Enzyme –Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Serum Antibodies to West Nile Virus in Multiple Avian Species.* Journal of Clinical Microbiol. 41: 1041-47, 2003
6. Dupuis, A., Marra, P., Reitsma, R., Jones, M., Louis, K. & Kramer, L. *Short Report: Serologic Evidence of West Nile Virus transmission in Puerto Rico and Cuba* Am. J. Trop. Med. Hyg. 2: 474-77, 2005
7. Kilpatrick, A.M., Daszak, P., Jones, M.J., Marra, P.P. & Kramer, L.D. *Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission* Proc. Biol. Sci. 22: 273(1599):2327-33, 2006
8. Cupp, E., Scherer, W., Lok, J., Brenner, R., Dziem, G., Ordoñez, J. *Entomological studies at an enzootic Venezuelan equine encephalitis virus focus in Guatemala, 1977-1980* Am. J. Trop. Med. Hyg. 4: 851-59, 1986



\*Danilo Alvarez,

\*María Eugenia Morales-Betoulle<sup>1</sup>,

\*Luis Eduardo Martínez,

‡ Nicholas Komar,

+ Jean-Luc Betoulle,

‡ Nicholas Panella,

\* Carmen Lucía Contreras,

\* Celia Cerdón-Rosales.

\*Centro de Estudios en Salud del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala

<sup>1</sup> emorales@gt.cdc.gov

‡Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado, USA

+Fundación Mario Dary Rivera.