

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

ENCUESTA SEROLÓGICA DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN AVES
RESIDENTES SILVESTRES Y DOMÉSTICAS, EN EL MUNICIPIO DE PUERTO
BARRIOS, IZABAL, GUATEMALA.

Luis Eduardo Martínez Villegas.

Guatemala
2005

ENCUESTA SEROLÓGICA DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN AVES
RESIDENTES SILVESTRES Y DOMÉSTICAS, EN EL MUNICIPIO DE PUERTO
BARRIOS, IZABAL, GUATEMALA.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

ENCUESTA SEROLÓGICA DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN AVES
RESIDENTES SILVESTRES Y DOMÉSTICAS, EN EL MUNICIPIO DE PUERTO
BARRIOS, IZABAL, GUATEMALA.

Trabajo de graduación presentado por
Luis Eduardo Martínez Villegas para optar al grado
de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2005

Vo.Bo. Asesor Principal.

Dra. María Eugenia Morales-Betoulle

Tribunal

Dra. María Eugenia Morales-Betoulle

Licda. Celia Cordón-Rosales

Dr. Héctor Aguilar.

Fecha de aprobación:

Guatemala 24 de Noviembre de 2005.

PREFACIO

Al finalizar este proyecto quiero agradecer inicialmente a Dios y a los médicos que me han dado la oportunidad de alcanzar este momento, especialmente por el orgullo y responsabilidad que me confiere ser un sobreviviente de cáncer.

Dedico este informe a mis padres por su afecto, cuidados, apoyo y por ser un gran ejemplo de trabajo y dedicación personal y en el trabajo. A mi hermano Juan Pablo por ser el mejor regalo que me ha dado la vida. A mi hermano mayor Roberto y a su esposa Lucía por su constancia y por la alegría que me da compartir con ellos este triunfo. A Carlo Roberto, María Mercedes, Luis Carlos y Marianita mis “sobrinitos” que son una fuente inagotable de sonrisas, a pesar de ser tan traviesos.

Agradezco el apoyo recibido por el Centro de Estudios en Salud del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, y al Medical Entomologic Research and Training Unit / Guatemala – Centers for Disease Control and Prevention (CES-MERTU/G-CDC).

Por otra parte agradezco a:

A la Doctora María Eugenia Morales-Betoulle por su vital labor en mi formación universitaria y profesional, por su consideración, paciencia y sobre todo por permitirme ser parte de este proyecto.

Al equipo de campo WNV: Danilo, Jean-Luc, Sheny, Wicho, Aquiles por su amistad y por el gran esfuerzo realizado en cada uno de los viajes de campo. A la Fundación Mario Dary (FUNDARY) por su apoyo en Izabal.

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí días enteros de trabajo, aprendí a trabajar con eficiencia y con quienes formamos una enriquecedora amistad: Paola, Carmen Lucía, Rodrigo, Ale E, Ale C y Ale K. A José Roberto Ramírez por su

gran trabajo en el manejo y procesamiento de toda la información generada. A Fredy Mejía por su incondicional ayuda y orientación durante el análisis estadístico de los datos.

A los amigos que la carrera universitaria me regaló, aquellos de quienes aprendí y considero ejemplo como personas y profesionales: Kate, Calu, Fredy, Oscar, Bea, Mish, Peter, Steph, Christian, Jimena, Mariela, Annette, Angela, Rods, Prichy, Claudia y René. Así mismo a mis amigos eternos del colegio: Omar, Víctor y Carlos.

Especialmente agradezco al Doctor Héctor Aguilar por ser una excelente persona, catedrático y orientador para tomar decisiones durante mi satisfactoria experiencia en la UVG.

CONTENIDOS

	Página
PREFACIO.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE FÓRMULAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
A. Ciclos naturales de patógenos transmitidos por vectores.....	3
1. Arbovirus.....	3
2. Vectores de arbovirus.....	4
3. Hospederos vertebrados.....	4
B. El Virus del Oeste del Nilo.....	5
1. Historia.....	6
2. Distribución geográfica.....	6
3. Biología molecular.....	8
4. Epidemiología molecular.....	12
5. Ciclo en la Naturaleza.....	13
6. Vectores.....	15
7. Reservorios.....	16
8. Efectos del VON en aves del Hemisferio Occidental.....	17
9. Modos alternativos de transmisión.....	18
10. Descripción clínica en aves.....	18
11. Monitoreo en aves centinelas.....	19
12. Prevención y control.....	21
a. Educación pública.....	21
b. Control de vectores.....	22
c. Vacunas.....	22

13. Progresión del virus, implicaciones respecto a las aves en peligro de extinción.....	22
C. Técnicas de detección moleculares y serológicas para el VON.....	24
1. RT-PCR en tiempo real.....	24
2. Ensayo de ELISA.....	25
3. PRNT.....	28
D. Migración de aves.....	29
E. Descripción de la zona de estudio	29
1. Punta de Manabique.....	30
2. Machacas del Mar.....	31
3. Ciudad de Puerto Barrios.....	32
III. JUSTIFICACIÓN.....	33
IV. OBJETIVOS.....	35
1. Objetivo general.....	35
2. Objetivos específicos.....	35
V. HIPÓTESIS.....	36
VI. METODOLOGÍA.....	37
A. Métodos.....	37
1. Sitios de trabajo y estaciones para tomar muestras.....	37
2. Captura de aves residentes silvestres y domésticas.....	39
3. Determinación del porcentaje de aves migratorias en cada sitio.....	39
4. Toma de muestra de sangre de las aves.....	40
5. Identificación de las muestras.....	40
6. Almacenamiento de información de las muestras y datos de campo.....	41
7. ELISA de bloqueo.....	41
8. Prueba de Reducción de Placas por Neutralización (PRNT).....	44
9. Análisis estadístico.....	45
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
A. Determinación de la proporción de aves migratorias versus residentes en los diferentes sitios y épocas de estudio.....	47
1. Resultados obtenidos por captura en redes de niebla.....	47

2. Resultados obtenidos por censos de aves.....	50
B. Determinación de la incidencia de anticuerpos contra VON en muestras de aves residentes (silvestres y domésticas).....	54
1. Resultados del ELISA de bloqueo.....	54
2. Validación de la prueba de ELISA de bloqueo por la prueba estándar de oro, PRNT.....	55
C. Correlación entre la incidencia de VON y la proporción de aves migratorias...	59
VIII CONCLUSIONES.....	64
IX. RECOMENDACIONES.....	65
X. LITERATURA CITADA.....	66
XI. APÉNDICES.....	70
A. Boleta de datos de campo.....	70
B. Listado de aves identificadas durante el trabajo de campo	71
C. Mapas de seropositividad en Izabal (considerando aves silvestres y domésticas)	74
D. Aves residentes positivas por ELISA de bloqueo.....	79
E. Especies de aves muestreadas en cada sitio de trabajo.....	81
F. Glosario.....	82

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Relación entre meses de trabajo y la época de migración de las aves.....	38
2. Porcentaje normalizado de aves migratorias por sitio y época de estudio según el método de redes.....	47
3. Análisis de ANOVA con los datos obtenidos por conteo en las redes.....	48
4. Porcentaje normalizado de aves migratorias por sitio y época de estudio según el método de censos.....	51
5. Análisis de ANOVA con los datos obtenidos por conteo en los censos.....	51
6. Porcentaje de aves residentes positivas contra VON según el método de ELISA de bloqueo con el anticuerpo monoclonal 3.1112G.....	54
7. Comparación de los resultados obtenidos por ELISA de bloqueo y PRNT, con muestras de los Departamentos de Escuintla, Santa Rosa, Izabal, Chiquimula y Petén.....	56
8. Análisis de X^2 comparando los resultados de ELISA de bloqueo y PRNT.....	56
9. Títulos de PRNT a 90% para VON, en las muestras de aves silvestres confirmadas como positivas para anticuerpos contra VON.....	58
10. Análisis de correlación de Pearson para datos normalizados de incidencia y porcentaje de aves migratorias, para ambas metodologías de conteo de aves.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribución del VON en Norteamérica hasta septiembre de 2005...	7
2. Genoma de ARN simple hebra (+) del VON.....	9
3. Ciclo de replicación del VON en la célula hospedera.....	10
4. Micrografía electrónica del VON en cerebro de un cuervo muerto....	11
5. Representación simplificada del árbol filogenético del VON.....	12
6. Ciclo de transmisión del VON en la naturaleza.....	13
7. <i>Culex pipiens</i> . depositando huevos.....	14
8. Aspectos geográficos del ciclo de transmisión del VON.....	16
9. Diagrama de un ELISA de bloqueo.....	27
10. Fotografía de una placa de prueba de ELISA de bloqueo.....	28
11. Playa de Punta de Manabique.....	30
12. Ganado bovino en la finca Machacas del Mar.....	32
13. Área verde del Instituto Luis Pasteur, Puerto Barrios.....	32
14. Mapa de una placa para ELISA de bloqueo para diagnóstico serológico del VON.....	41
15. Variación del porcentaje de aves migratorias por sitio según método captura con redes.....	49
16. Variación del porcentaje de aves migratorias por sitio según método de censo.....	52
17. Relación entre incidencia de anticuerpos contra VON en aves residentes y el porcentaje de aves migratorias según capturas en red.....	60
18. Relación entre incidencia de anticuerpos contra VON en aves residentes y el porcentaje de aves migratorias según censos.....	61

LISTA DE FÓRMULAS

Fórmula	Página
1. Determinación del porcentaje de inhibición en ELISA de bloqueo...	43
2. Transformación de arcoseno.....	45

RESUMEN

Desde su aparición en el continente americano en 1999 el Virus del Oeste del Nilo (VON), se ha esparcido a través de las Américas, empleando probablemente a las aves migratorias como vehículo para alcanzar nuevas zonas geográficas. En el presente estudio se buscó evidencia serológica de la presencia del VON en aves residentes domésticas y silvestres, en tres sitios de Izabal, Guatemala (Punta de Manabique, Machacas del Mar y Puerto Barrios). Además, en estos sitios se esperaba hallar diferentes proporciones de aves migratorias a residentes. De esta forma se pretendía evaluar la probable relación inversa entre la incidencia de VON en aves residentes y la proporción de aves migratorias.

Empleando la técnica de ELISA de bloqueo se determinó que Puerto Barrios registró la mayor incidencia de anticuerpos contra VON (28.28%), seguido de Machacas del Mar (18.38%) y finalmente de Punta de Manabique (7.03%). Se validó los resultados obtenidos enviando un subgrupo de muestras al CDC en Fort Collins para su confirmación por el ensayo de Reducción de placas por Neutralización (PRNT por sus siglas en inglés). Se determinó que el ELISA de bloqueo es una técnica aceptable en términos de especificidad (85.71%) y sensibilidad (100%) para el diagnóstico de VON en Guatemala. Esta evidencia indica que el VON, probablemente, ha circulado en la región caribe de nuestro país. Se empleó dos metodologías de conteo de aves (captura en redes y censos) para determinar la proporción de aves migratorias a residentes en cada sitio durante cuatro distintas épocas de migración de las aves. Analizando los datos obtenidos con una prueba de ANOVA de dos factores sin repetición, se logró hallar diferencias estadísticamente significativas en la proporción de aves migratorias en cada sitio, para cada una de las distintas épocas. Aplicando una prueba de correlación de Pearson se logró establecer la existencia de una leve relación inversa (estadísticamente no significativa), entre la incidencia de VON en aves residentes y la proporción de aves migratorias registrada por censos en el sitio de muestreo.

I. INTRODUCCIÓN

El Virus del Oeste del Nilo (VON) es un arbovirus de la familia *Flaviviridae* que afecta principalmente, en Norteamérica, a aves de la familia *Corvidae* y cuyo ciclo de transmisión en la naturaleza involucra a un vector artrópodo. En el año de 1999 se produjo un brote inesperado de VON en la ciudad de Nueva York y a partir de allí hasta la fecha se ha reportado evidencia serológica de su circulación en aves y otros mamíferos hospederos en Canadá, México, Islas del Caribe y El Salvador. Esto puso en evidencia la versatilidad y capacidad de este arbovirus para introducirse en un hemisferio en el cual no había previo reporte del mismo, y en el cual se distribuyó rápidamente hallando vectores y hospederos competentes pese a tratarse de un nuevo nicho ecológico. Se ha considerado la posibilidad que su amplia distribución por el continente americano puede deberse a que el VON está siendo introducido velozmente en nuevas zonas por aves migratorias infectadas.

La región del caribe de Guatemala, Departamento de Izabal, es un punto importante en la ruta de migración de las aves neárticas sobre nuestro país. Se estima que el VON podría ser introducido en la zona, por aves migratorias, pasando así a poblaciones de aves residentes silvestres y domésticas. Además, podría hallar hospederos reservorios y amplificadores competentes en aves u otros vertebrados del área. Esto incrementaría el riesgo de infecciones severas para aves en peligro de extinción, así como para otros hospederos tangenciales como caballos y otros mamíferos de importancia a la economía agraria de la región.

El monitoreo y detección de la actividad del VON en aves, en el Caribe y Sur de México indican que el virus podría hallarse en Guatemala. Por ello el desarrollo de un estudio preliminar para generar resultados base, es importante. El monitoreo activo por medio de recolección de muestras de suero de aves residentes silvestres y domésticas permitirá obtener evidencia serológica de la circulación de VON en la zona, aportando resultados y criterios para la elección de sitios de vigilancia previendo eventuales brotes. El estudio en aves, complementado por la futura búsqueda de vectores y otros hospederos competentes en el área, aportará conocimiento sobre el ciclo en la naturaleza del VON.

Se han reportado varios arbovirus circulantes en América latina, muchos de los cuales son agentes etiológicos en aves, humanos y otros mamíferos, de afecciones al Sistema Nervioso Central, al igual que el VON. Por ello el control de la actividad de VON, empleando suero de aves, u otros hospederos, requiere de una metodología de trabajo bien definida que abarque varios aspectos, siendo uno de los eslabones en la cadena de vigilancia el diagnóstico serológico diferencial del VON. Esto se debe a la posibilidad de que virus de la misma familia circulen en una misma área y afecten a los mismos hospederos. En 2003, Blitvich *et al.*, describieron el ensayo de ELISA de bloqueo como prueba de tamizaje y detección de VON para aves y otros vertebrados. Este ensayo no se ha establecido en Guatemala como rutina para diagnóstico arboviral. Debido a su relativo bajo costo, y al amplio rango de hospederos que se puede evaluar, se considera como una buena opción para aplicar como base de un sistema de vigilancia para VON en poblaciones aviares. Los resultados de esta prueba pueden ser confirmados por la Prueba de Reducción de Placas por Neutralización (PRNT por sus siglas en inglés), estándar de oro en la detección de anticuerpos contra virus en muestras serológicas.

No se ha reportado mortandad en aves en Guatemala debido a VON. Esto no implica que el virus no pueda hallarse circulando en aves residentes de nuestro país. El trabajo preliminar en la obtención de evidencia serológica de que el VON se halla en la región caribe del país, permitirá aportar criterios para que las autoridades pertinentes, tomen medidas preventivas para la vigilancia de esta arbovirosis. Los resultados obtenidos aportarán datos básicos que permitan comprender aspectos ecológicos en el ciclo de transmisión del VON, en regiones tropicales. Además se aportará evidencia para la evaluación del posible riesgo de morbilidad o mortandad para poblaciones de aves residentes.

II. ANTECEDENTES

A. Ciclos naturales de patógenos transmitidos por vectores.

Una gran cantidad de patógenos se mantienen en la naturaleza mediante ciclos que involucran hospederos vertebrados y vectores artrópodos hematófagos. Estos tres elementos se hallan en una interacción dinámica con su ambiente. Los patógenos transmitidos por vectores, deben replicarse y/o desarrollarse tanto en el vector como en el vertebrado hospedero. Al alimentarse, el vector puede ingerir y ser infectado por el patógeno hallado en el sistema circulatorio o la piel del hospedero. Al alimentarse de nuevo, el vector puede transmitir al patógeno a nuevos hospederos vertebrados, potencialmente susceptibles. Usualmente, el patógeno no afecta al artrópodo vector, mientras que la infección en el hospedero vertebrado (especialmente en hospederos tangenciales) genera morbilidad y/o mortandad significativa (Marquardt *et al.*, 2005).

El mecanismo básico, y generalidades del ciclo en la naturaleza de un patógeno transmitido por vectores, es claramente ejemplificado por las interacciones entre un virus transmitido por artrópodos (arbovirus) su vector y su hospedero (Marquardt *et al.*, 2005).

1. Arbovirus. Los arbovirus son extremadamente pequeños, oscilando entre 20 a 300 nm. La mayoría de arbovirus poseen un genoma de ARN pequeño, el cual codifica para algunas proteínas. Se conoce más de 500 arbovirus. Los arbovirus son parásitos intracelulares obligados, puesto que dependen de la célula hospedera para replicarse y sintetizar proteínas. Los virus poseen una etapa infecciosa llamada virión^{1*} y una etapa de replicación intracelular llamada fase de eclipse. En la mayoría de estos virus el virión posee una envoltura que obtiene al pasar a través de alguna membrana celular, la cual contiene glicoproteínas virales. El virión dentro de la envoltura está formado por proteínas y el material genético, asociados, lo cual se denomina nucleocápside.

Para contribuir a la integridad de su ciclo, un arbovirus debe ser capaz de infectar y replicarse tanto en el vector como en el hospedero vertebrado. Para que el ciclo de transmisión permanezca intacto, el arbovirus debe generar niveles de viremia (virus en la sangre) elevados en el hospedero vertebrado. Si la viremia es prolongada se maximizan la

¹ Referirse a la sección XI, Apéndice F.

oportunidad de infectar a un vector y la transmisión mecánica del virus. El virus no debe ser extremadamente virulento, de forma que el hospedero no muera antes de que nuevos vectores sean infectados. A su vez, el virus, generalmente genera pocos o ningún efecto negativo en el vector natural (Marquardt *et al.*, 2005).

2. Vectores de arbovirus. En el caso de un arbovirus, el vector es un artrópodo, generalmente hematófago, que puede transmitir al patógeno de un hospedero vertebrado a otro. Esta transmisión puede ser mecánica o biológica. El modo de transmisión biológica para un arbovirus es propagativo, e implica que éste se multiplica un número indeterminado de veces en el vector, manteniéndose en la misma fase de desarrollo. En contraste, el modo de transmisión mecánico no involucra desarrollo o replicación del arbovirus en el vector, éste simplemente lo transmite, por un período corto, durante su siguiente alimentación hasta que el virus se inactiva. Ambas formas de transmisión no son mutuamente excluyentes ni mutuamente incluyentes. Sin embargo se debe remarcar que existe una, o unas pocas especies competentes para la transmisión biológica debido a las barreras que el virus debe pasar (por ejemplo glándulas salivares, tracto digestivo y ovarios). En el caso de estas especies puede ocurrir transmisión vertical del artrópodo hembra hacia su progenie (Marquardt *et al.*, 2005).

3. Hospederos vertebrados. Se considera hospedero a cualquier vertebrado capaz de ser infectado por el virus y desarrollar suficiente viremia para infectar vectores que se alimenten de él. El hospedero puede contribuir al componente de mantenimiento o amplificación viral en el ciclo de transmisión (Marquardt *et al.*, 2005).

Un hospedero reservorio es aquel que permite el mantenimiento del virus por un tiempo prolongado, sin experimentar efectos negativos por la infección. Su característica principal es que desarrollan viremias elevadas por períodos extensos lo cual facilita la infección de otros vectores. Las poblaciones de estos hospederos deben ser numerosas para garantizar la existencia de individuos susceptibles a la infección. Además los hospederos reservorios, migratorios pueden dispersar al arbovirus a nuevas localidades (Marquardt *et al.*, 2005).

Los vertebrados involucrados en la amplificación de la presencia del virus en varios vectores, y consecuentemente en más vertebrados, se denominan hospederos amplificadores. Estos hospederos se reproducen anualmente o con mayor frecuencia, lo cual provee de suficientes individuos susceptibles según la actividad de los vectores (Marquardt *et al.*, 2005).

Por ejemplo, en aves, cada verano los pichones de aves sirven como una nueva fuente de individuos susceptibles. Estos individuos sostienen elevadas viremias que generan olas de infección en nuevos vectores y otras aves susceptibles. Pese a que estos hospederos amplificadores no se hallen presentes por todo el año, puesto que desarrollan inmunidad, éstos pueden ser responsables del elevado número de virus en el ambiente (Marquardt *et al.*, 2005).

Un hospedero tangencial es aquel que no se halla involucrado usualmente en la amplificación o mantenimiento del virus. En este caso estos vertebrados desarrollan niveles de viremia muy bajos, por lo que la transmisión a nuevos vectores es escasa o inexistente. Sin embargo, en el caso de humanos y otros animales, su ingreso accidental al ciclo de transmisión arboviral puede ocasionalmente, generar niveles elevados de morbilidad y mortandad (Marquardt *et al.*, 2005).

La respuesta inmune del hospedero vertebrado es importante debido a que limita la infección arboviral, puesto que los anticuerpos producidos limitan la duración de la viremia, deteniendo la transmisión a otros vectores. Además, una vez expuesto al arbovirus, el individuo genera inmunidad ante subsecuentes infecciones por el mismo virus (Marquardt *et al.*, 2005).

El comportamiento de estos hospederos influye en el mantenimiento y transmisión del arbovirus, en caso de tratarse de individuos que se movilizan extensamente o bien migran a sitios distantes. Esto pone en contacto al arbovirus con nuevas poblaciones de vectores, lo cual podría iniciar el ciclo infectivo en dicha localidad o reintroducirlo en sitios donde ya se había extinto (Marquardt *et al.*, 2005).

B. El Virus del Oeste del Nilo (VON).

El Virus del Oeste del Nilo es el agente causal de la fiebre del Oeste del Nilo, una infección en humanos similar al dengue. Es uno de los arbovirus más distribuidos,

extendiéndose, hasta tiempos recientes, desde África, el Medio Oriente, Europa y Asia Occidental hasta América. El VON es naturalmente un virus aviar, transmitido entre diversas aves primariamente por mosquitos ornitofílicos, a pesar de que se ha reportado aislados virales en mamíferos, anfibios, otros mosquitos y pulgas (McLean *et al.*, 2002).

1. **Historia.** El VON fue descrito por primera vez en 1937 luego de ser aislado a partir de una muestra de sangre de una mujer febril en el distrito del Nilo Occidental en Uganda. A partir de ese incidente se le conoció como el agente etiológico de la fiebre del Nilo Occidental, y fue aislado ocasionalmente en niños febriles en África del Norte y el Medio Oriente a partir de 1950. En 1957 se reportó más de una docena de casos de encefalitis por VON en pacientes ancianos en Israel, lo cual indicó por primera vez que el VON podía causar graves infecciones en el Sistema Nervioso Central. En 1974 ocurrió la mayor epidemia de VON registrada, causando aproximadamente 10,000 casos febriles en humanos, en Sudáfrica. En 1996 el VON emergió como el agente principal de un brote de encefalitis arboviral en Rumania el cual causó 393 casos incluyendo 16 muertes. A partir de 1996 se han reportado brotes de encefalitis viral ocasionada por VON en humanos y caballos, con mayor frecuencia en la cuenca del Mediterráneo (1999, 2001) en Rusia (2001) y Australia (2002). En 1997 se aisló en Israel una nueva cepa del virus capaz de matar gansos domésticos. Una cepa idéntica emergió en 1999 en la ciudad de Nueva York, Estados Unidos (Komar, 2005). Su aparición en América constituyó un recordatorio de la extrema habilidad de los virus, incluyendo los arbovirus para atravesar continentes y hemisferios (Campbell *et al.*, 2002).

En Norte América se aisló la cepa Nueva York 1999 (NY99) a partir de un cadáver de un Cuervo americano (*Corvus brachyrhynchos*) y subsecuentemente de cadáveres de 22 especies de aves, colectados en el período de Agosto a Noviembre de 1999. Simultáneamente, se detectó secuencias de ARN específicas para VON en muestras de cerebro colectadas durante las autopsias de casos humanos fatales (Komar, 2005).

2. **Distribución geográfica.** La distribución geográfica reportada del VON es de 40 países aproximadamente, abarcando cuatro continentes, desde África, Medio Oriente, Europa, el sur de Asia, Norteamérica (McLean *et al.*, 2002).

Además ya se halló evidencia serológica en el Caribe y El Salvador como se detalla más adelante.

Esta distribución se conoce a partir de brotes de VON en humanos y caballos, ciclos epizooticos en aves y monitoreo serológico en hospederos vertebrados. En África se ha reportado VON en la mayoría de países en los que se han realizado estudios de monitoreo arboviral, desde Sudáfrica y Madagascar en el extremo sur, hasta Marruecos, Túnez, Egipto y Argelia en el norte. El rango del VON se extiende hacia el sur de Asia, a través del Medio Oriente, alcanzando Pakistán y la India. Se extiende hacia el norte hasta Rusia y al oeste a través del sur de Europa. Una variante del VON, el virus Kunjin, se halla presente en Australia y el sureste asiático (Komar, 2005).

El VON no había sido descrito en América hasta 1999, año en el cual fue introducido sorpresivamente en Nueva York, Estados Unidos. Hasta septiembre de 2005 el VON se había extendido por todo el territorio estadounidense, reportándose casos en humanos, aves, zancudos y otros vertebrados (CDC, 2005); se reportó también en las provincias canadienses de Saskatchewan, Manitoba, Ontario, Québec y Nueva Escocia (Komar, 2005); así mismo se registró su aparición en los estados mexicanos de Chihuahua, Tamaulipas, Veracruz, Tabasco (Estrada-Franco *et al.*, 2003) así como en Coahuila (Blitvich *et al.*, 2003) y Yucatán (Loroño-Pino *et al.*, 2003). En el Caribe se ha descrito la circulación del VON en Islas Caimán, Jamaica (DuPuis *et al.*, 2003), Guadalupe (Quirín *et al.*, 2004) y la República Dominicana (Komar *et al.*, 2003). En la Figura 1 se observa su distribución en el continente norteamericano así como algunos países en los que se ha reportado evidencia serológica.

En Centro América y Sur América se ha reportado serologías positivas. Por ejemplo en 2005 se reportó casos positivos en El Salvador (Cruz *et al.*, 2005). El reporte más reciente de evidencia serológica proviene de Puerto Rico y Cuba (Dupuis *et al.*, 2005).

Se cree que la distribución de VON es más extensa que la registrada hasta fines de 2004, y podría abarcar todo el Caribe y Centro América, y potencialmente una vasta región de Sur América (Peterson *et al.* 2004)



(Modificado de Komar, 2005)

Fig.1. Distribución del Virus del Oeste del Nilo en Norteamérica hasta septiembre de 2005. Los puntos en el sur de California y las islas Caimán representan casos humanos únicos, mientras que los puntos en Méjico, Jamaica, República Dominicana y El Salvador representan evidencia serológica de transmisión local en caballos (Méjico, El Salvador) y aves (países del Caribe).

3. **Biología molecular.** La familia *Flaviviridae* consiste en tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. Los miembros de estos distintos géneros se relacionan

distantemente, pero comparten el orden secuencial de sus genes y arreglos proteicos no estructurales conservados (Brinton, 2002).

La división de un género en niveles subgenéricos basado en secuencias moleculares depende de la definición de especies. Actualmente, una especie viral se define como «una clase de virus politético constituyendo un linaje de replicación y ocupando un nicho ecológico particular», esta definición fue adoptada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus. Mientras todos los sistemas de clasificación, incluyendo las técnicas serológicas y la clasificación basada en la secuenciación de nucleótidos presentan inconvenientes, la combinación de los antes mencionados, con un bajo nivel de discrepancia entre ambos, representan la mejor opción para mejorar la clasificación de virus siguiendo el concepto politético para la definición de una especie (Kuno *et al.*, 1998).

Los aproximadamente 70 virus clasificados actualmente en el género *Flavivirus* se subdividen en doce serogrupos antigénicos. El VON es un miembro del serogrupo del Virus de Encefalitis Japonesa, el cual incluye también a los virus Cacipacore, Kuotango, JE, de Encefalitis del Valle Murria, de Encefalitis de San Luis, Usutu y Yaounde. Basado en homologías en su secuencias, el virus Kunjin, endémico de Australia y Asia, es considerado ahora como un subtipo del VON (Brinton, 2002).

La partícula viral esférica tiene aproximadamente 50 nm de diámetro y consiste en una bicapa lipídica derivada del hospedero, rodeando la nucleocápside que contiene Ácido Ribonucleico de simple hebra (ARN sh {+}) de aproximadamente 11,000 nucleótidos. Dentro de la envoltura se hallan las proteínas virales de envoltura y de membrana, responsables de propiedades importantes del virus, incluyendo rango de hospederos, tropismo tisular, replicación, ensamblaje y estimulación de la respuesta inmune por células B y T (Campbell *et al.*, 2002).

El genoma de ARN consiste en una pequeña región no codificadora 5', seguida por un solo marco de lectura abierta, que codifica para tres proteínas estructurales y siete no estructurales (NS) en el siguiente orden: cápside- membrana- envoltura- NS1- NS2A- NS2B- NS3- NS4A- NS4B- NS5- región no codificadora 3', como se muestra en la Figura 2. La replicación viral ocurre en el citoplasma, en estrecha asociación con el retículo

endoplasmático, seguida por el ensamblaje en el lumen del RE, y su posterior salida de la célula a través del aparato de la ruta de secreción celular (Campbell *et al.*, 2002)

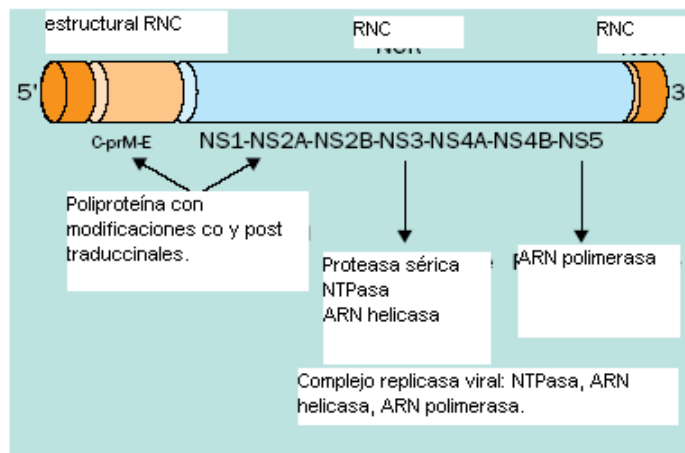


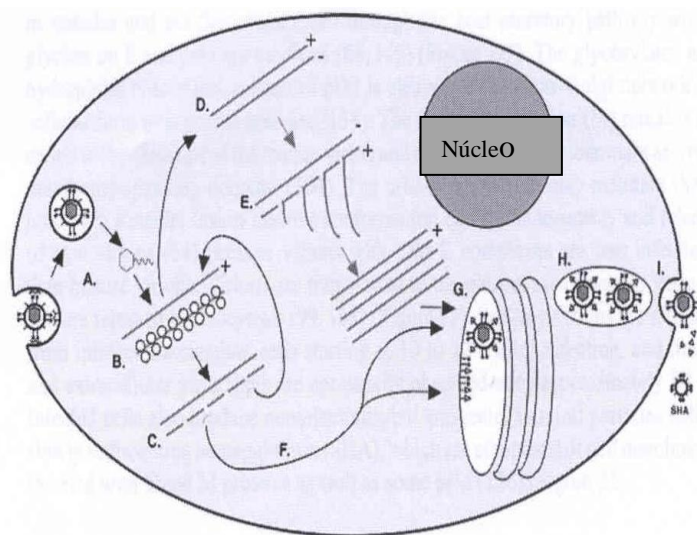
Fig 2. Genoma de ARN simple hebra (+) del VON (modificado de Campbell *et al.*, 2002)

El único gen del VON codifica a una proteína precursora, que luego de ser seccionada por una serina proteasa, y otras proteasas celulares, da origen a las proteínas ya mencionadas. Los glycosaminoglicanos juegan un papel especial en el ingreso a la célula por parte de los flavivirus aunque estudios del virus de Dengue IV sugieren que otras moléculas de superficie de la célula hospedera son requeridas para el ingreso del virus. Debido a que los flavivirus se transmiten entre un insecto y un hospedero vertebrado durante su ciclo natural de transmisión, es probable que el receptor celular que utilicen sea una proteína altamente conservada. Luego de unirse al receptor celular, el virión penetra a la célula por endocitosis mediada por el receptor, seguido de la fusión por pH bajo, de la membrana viral con la membrana vesicular del endosoma, lo cual libera la nucleocápside en el citoplasma. El genoma del virus, dentro de la célula, permanece en posición episomal*, y no penetra en el núcleo.

La traducción del ARN viral, comienza luego de su liberación de las 3 proteínas estructurales y continúa con la participación de al menos dos familias de enzimas (OAS y

PKR; 2', 5' oligoadenilato sintasa, y proteína kinasa dependiente de ARN). Estas son activadas por un efecto doble cadena del ARN, y actúan sobre el ARN viral desnudo, el cual cumple dos funciones: como ARNm* en la síntesis de la proteína precursora, y como matriz de su propia replicación, con la participación de una RdRp (Polimerasa de ARN dependiente de ARN). El proceso es semiconservativo y asimétrico. Posteriormente, en asociación con membranas del Retículo Endoplasmático, se produce el ensamblaje del ARN con los polipéptidos derivados de la proteína precursora.

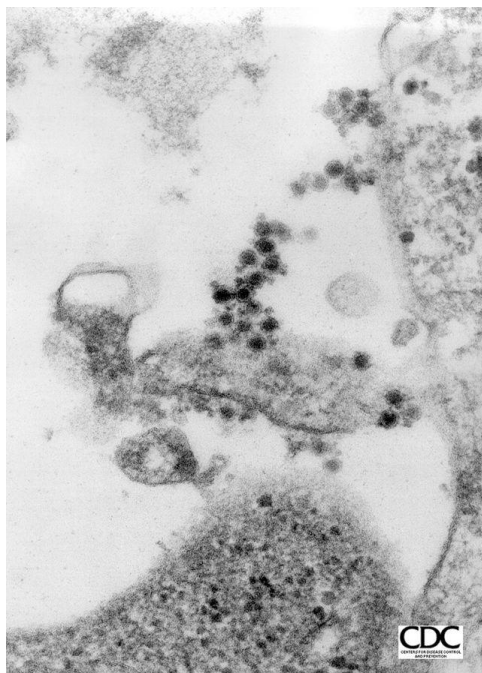
El virión es transportado hacia la membrana plasmática en vesículas y es liberado por exocitosis. La progenie de viriones son liberados de las células de mamíferos infectados empezando de 10 a 12 horas post infección. No se observa títulos máximos de virus extracelular hasta que han transcurrido 24 horas aproximadamente (Brinton, 2002). El proceso de ingreso del virus hasta su salida de la célula infectada se muestra en la figura 3.



(modificado de Brinton, 2002).

Fig. 3. El ciclo de replicación del VON. A. anclaje e ingreso del virión. B. desprendimiento de capa proteica y traducción. C. Procesamiento proteolítico de la poliproteína. D. Síntesis de hebra ARN (-). E. Síntesis del genoma del virus, ARN (+). F. Transporte de proteínas estructurales a las membranas de las vesículas citoplasmáticas. G. Encapsidación del genoma nascente de ARN y salida de los viriones. H. Movilización del virión hacia la superficie celular.

Se ha determinado la capacidad del VON para replicarse en varias líneas celulares, incluyendo células de gallina primaria, células embrionarias de pato y ratón, y líneas celulares continuas de mono, humano, cerdo, roedores, anfibios e insectos. Sin embargo no ocasiona citopatología en todas las líneas celulares. En la figura 4 se muestra los efectos citopáticos* en tejido cerebral de un cuervo muerto.

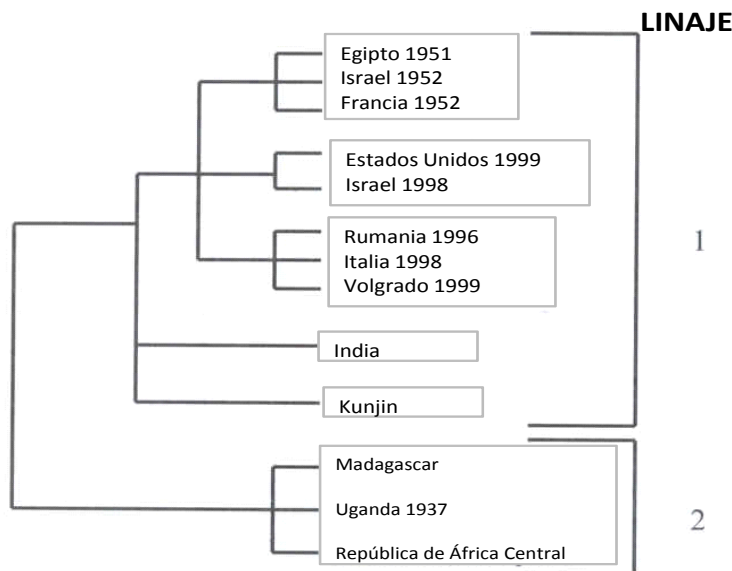


(CDC, 2002)

Fig 4. Micrografía electrónica del VON en tejido cerebral de un cuervo muerto.

4. Epidemiología molecular. Desde 1937 se han aislado varias cepas de VON. Filogenéticamente estas cepas constituyen un grupo de virus íntimamente relacionados. Se han descrito dos linajes genéticos separados de VON. Se coloca a las cepas de Europa, Medio Oriente, sur de Asia, Australia (Kunjin) y Norteamérica en el Linaje 1 (ver Figura 5). Este linaje incluye las cepas que han causado brotes de encefalitis en humanos y caballos. También incluye algunas cepas de África. El Linaje 2 incluye las cepas del sur de África, incluyendo algunas del África central y del prototipo de la cepa de Uganda aislada en 1937. A pesar de que los virus pertenecientes al Linaje 2 no se han asociado con brotes infecciosos graves, una de las cepas de Sudáfrica fue la responsable del mayor

brote del que se tenga registro, causando más de 10,000 casos febriles leves en 1974. Estas cepas han causado casos aislados de encefalitis y hepatitis en humanos, encefalitis en caninos y equinos, y la muerte de un avestruz (Komar, 2005).



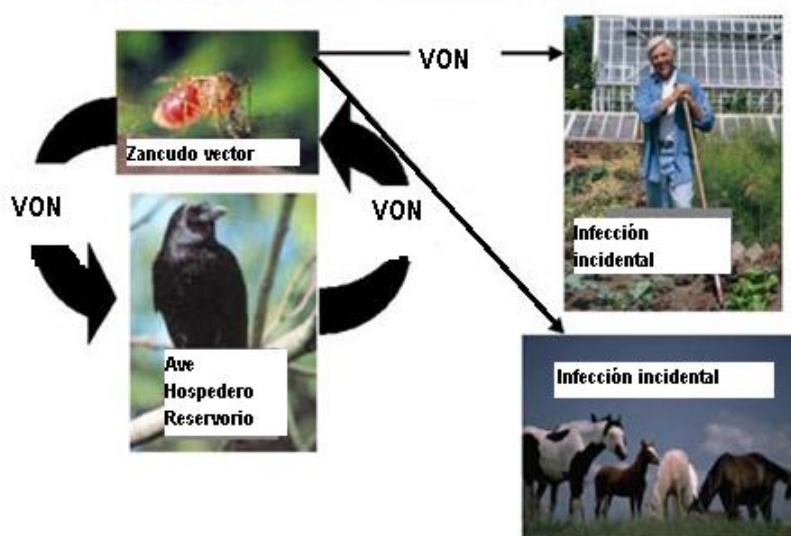
(modificado de Komar, 2005).

Fig. 5. Representación simplificada del árbol filogenético, mostrando la relación genética de las distintas cepas del VON, incluyendo su separación en dos linajes distintos.

El VON se halla más relacionado con flavivirus del complejo antigénico del Virus de Encefalitis Japonesa. En América se podría mencionar al Virus de Encefalitis de San Luis, Rocio, Ilheus y Cacipacore como los más cercanos (Komar, 2005). Un análisis filogenético reveló que pese a que el Virus de la Encefalitis de San Luis (VESL) presenta reacciones cruzadas con el VON en pruebas serológicas, el VESL pertenece a otro clado* que incluye miembros del serocomplejo Ntaya (Kuno *et al.*, 1998). Las reacciones cruzadas entre VESL y VON ocurren en bajos niveles relativamente (Komar, 2005).

5. Ciclo en la naturaleza. El VON se mantiene en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión mosquito-ave-mosquito, el cual involucra principalmente mosquitos del

género *Culex*. Pese a que se ha aislado VON en pulgas, en el hemisferio oriental, éstas probablemente no sean vectores epidémicos/epizoóticos del virus. Su papel en el mantenimiento del virus en la naturaleza se desconoce. El ciclo de transmisión del VON se muestra en la figura 6.



(modificado de CDC, 2002).

Fig.6. Ciclo de transmisión del VON en la naturaleza, indicando posibles hospederos tangenciales

Las aves son los hospederos reservorios naturales del VON, existiendo especies de aves capaces de actuar como hospederos amplificadores debido a las elevadas niveles de viremia que desarrollan. Al ser infectados algunas especies de aves sostienen estas viremias elevadas transitorias, las cuales permiten que mosquitos que se alimenten posteriormente de ellas adquieran la infección. Las aves infectadas usualmente sobreviven y adquieren inmunidad. Algunas especies reportadas hasta ahora, especialmente en Norteamérica, pueden presentar síntomas notorios y morir. Principalmente especies pertenecientes a la familia Corvidae (por ejemplo cuervos y azulejos). En Estados Unidos, las aves de esta familia son de vital importancia en el monitoreo y control de VON

basadas en aves muertas. Éstas permiten detectar y eventualmente dar seguimiento al virus en una región (Campbell *et al.*, 2002).

Dentro de las aves, se desconoce aún la taxa* que actúe como el mayor reservorio para el mantenimiento de la transmisión local de virus, y es muy probable que estos varíen geográficamente, dependiendo de la estructura de las comunidades locales de aves. (Peterson *et al.*, 2004)

El transporte de las cepas de VON entre distintas áreas por aves virémicas migratorias, que siguen rutas migratorias establecidas es una hipótesis. En el hemisferio oriental, se cree que el VON es introducido regularmente en el Mediterráneo y los países europeos por aves migratorias. No se sabe si estos ciclos enzoóticos relacionados con la movilización de aves migratorias se hallan establecidos en América. Sin embargo los siguientes hechos sustentan esta hipótesis: (1) El virus ha permanecido activo en los Estados Unidos por siete temporadas de transmisión consecutivas, lo cual evidencia un mecanismo eficiente para sobrevivir durante el invierno. (2) El virus ha exhibido una expansión geográfica explosiva en el territorio este de los Estado Unidos. (4) El virus ha infectado a un amplio rango de hospederos aviares y varias especies de mosquitos que constituyen vectores potenciales. (5) se detectó transmisión permanente a lo largo del período 2001-2002 en el estado de Florida, lo cual indica que el virus se convirtió en enzoótico en las áreas subtropicales de Estados Unidos (Campbell *et al.*, 2002).

Se ha reportado infecciones adquiridas en la naturaleza por mamíferos como: humanos y equinos. También se demostró la infección de VON en otras especies de mamíferos, como: conejos, ardillas, gatos y dos especies de murciélagos pueden ser infectados naturalmente (Campbell *et al.*, 2002). Además se ha reportado infecciones por VON en lagartos, zorrillos, ranas, lemures, etc (Peterson *et al.*, 2004).El rol de estos mamíferos en el ciclo de transmisión es desconocido. Los estudios experimentales sugieren que los caballos son hospederos tangenciales finales del VON (Campbell *et al.*, 2002).

6. **Vectores.** Muchos de los mosquitos vectores de VON en Europa, África, el Medio Oriente y Asia son los miembros ornitofílicos del género *Culex* (figura 7), incluyendo *C. tritaeniorhynchus* en el sur de Asia, *C. annulirostris* en Australia, *C.*

perexiguus en el norte de África y el Medio Oriente. El *C. pipiens* y *C. quiquefasciatus* son los principales vectores en las regiones de América en las que sus rangos se traslapan con la distribución de la actividad del VON (Komar, 2005). También se ha reportado aislados virales obtenidos en mosquitos de los géneros: *Aedes*, *Anopheles*, *Minomyia* y *Mansonia* en África, Asia y Los Estados Unidos.

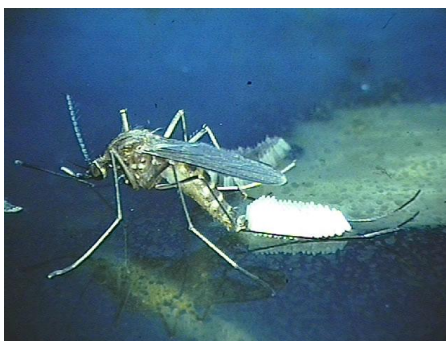


Fig 7. *Culex pipiens* depositando huevos (CDC, 2002).

Los mosquitos *Culex* son importantes debido a su potencial papel como vehículos para que el VON sobreviva durante el invierno en sitios de clima templado, donde hibernan como mosquitos adultos. La evidencia de campo para este fenómeno se observó en los meses fríos del año 2000, cuando se halló tres mosquitos, hibernando, infectados con VON adultos hibernantes *Cx. pipiens* en Nueva York, Estados Unidos (Komar, 2005).

Aun se desconoce el papel de otros artrópodos como pulgas, garrapatas, tábanos, etc, en el ciclo de transmisión del VON en Norteamérica. Por estudios en laboratorio se logró determinar la competencia vectorial de cuatro especies de garrapatas del género *Ornithodoros*. También se logró aislar VON en ectoparásitos del género *Hippoboscidae* (Komar, 2005).

7. **Reservorios.** Las aves son los hospederos vertebrados primarios del VON. Esto se determinó luego de extensos monitoreos serológicos en aves y mamíferos en diversos sitios, incluyendo Egipto, Israel, Sudáfrica, Pakistán, Rumania y otros. En estas regiones endémicas/enzoóticas, las aves fueron infectadas con frecuencia (según lo indica la presencia de anticuerpos) e infecciones experimentales demostraron que ciertas aves

desarrollan altos niveles de viremia. Esencialmente todos los hospederos vertebrados que fueron expuestos, por inoculación o por la picadura de un mosquito infectado presentaron niveles considerables de viremia y/o generaron anticuerpos. Sin embargo las aves se constituyen como importantes hospederos amplificadores del VON debido a que desarrollan niveles elevados de viremia, los cuales sostiene por tiempo suficiente para infectar a otros vectores (Komar, 2005). Las aves competentes sostienen niveles infectivos de viremia por 1-4 días post exposición. Según Dauphin *et al.*, luego de sostener la infección por este periodo, las aves desarrollan anticuerpos que inducen inmunidad contra VON por el resto de su vida. Humanos, caballos y otros mamíferos se constituyen como hospederos incidentales y terminales en el ciclo de transmisión debido a que no producen niveles significativos de viremia. Se cree que los reptiles podrían ser hospederos amplificadores potenciales, debido a que se conoce que si desarrollan niveles considerables de viremia y permiten la sobrevivencia del virus durante el invierno (Dauphin *et al.*, 2004). Las ranas, *Rana ridibunda* se han documentado como hospederos competentes (Peterson *et al.*, 2004).

8. Efectos del VON en aves del Hemisferio Occidental. La mortandad registrada hasta el momento en aves de Norte América puede deberse a que estas no habían estado expuestas a VON anteriormente, por lo que no tenían inmunidad adquirida ante este patógeno. Además se considera la posibilidad de que el VON circulando se trate de una cepa mas virulenta. La mortandad de aves por VON en la naturaleza puede verse incrementada por predadores y factores de estrés como pérdida de hábitat. Curiosamente, en el Hemisferio Oriental, se han registrado pocos casos en los que un brote de VON produzca síntomas en aves. En la región Neotropical no se ha esclarecido los efectos del VON, pese a la existencia del mismo en distintos países. En éstos, existen varios factores que podrían reducir los efectos del VON en aves tropicales, endémicas. Teóricamente, existe una exposición previa a otros virus de la familia *Flaviviridae*, lo que habría permitido desarrollar resistencia a infecciones severas a comunidades completas. Estos efectos no se han documentado (Peterson *et al.*, 2004).

Se sabe que al menos 10 especies neotrópicas han fallecido al entrar en contacto con el VON, en zoológicos de Norteamérica, así como aquellas que migran al Norte para

pasar el verano. Se cree que en regiones del trópico pueda darse un efecto de dilución causado por la mayor biodiversidad, en comparación con las regiones templadas. Esto reduciría las posibilidades de una epizootia en las áreas tropicales (Peterson *et al.*, 2004).

9. Modos alternativos de transmisión. Modos potenciales de transmisión alternativa del VON incluyen la transmisión vertical, y la transmisión por contacto directo entre hospederos vertebrados en ausencia de vectores artrópodos. Esta última posibilidad incluye la transmisión sexual, fecal-oral, por sangre, oral y por aerosol (Komar, 2005).

10. Descripción clínica en aves. Las aves infectadas por VON padecen de un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde sintomatología leve hasta la muerte. Se ha reportado mortalidad por VON en 198 aves de Norteamérica hasta el año 2002. Algunas especies de aves, especialmente córvidos, son especialmente susceptibles a la mortandad. Los signos generales de infección incluyen letargia, hemorragia y en algunos casos documentados postura anormal, en gansos. En 2003 Komar *et al.* reportó ataxia, e incapacidad para sostener firme la cabeza en *Larus delawarensis* (gaviota piquianillada). Debido a la elevada tasa de infección natural en aves durante ciclos epizoóticos, es difícil atribuir la sintomatología en aves seropositivas, a una infección por VON. La detección de la sintomatología aguda en el caso de aves cautivas, por ejemplo en zoológicos, es complicada. Esto se debe a que los cuidados veterinarios favorecen la sobrevivencia de aves con condiciones crónicas. Muchas de estas aves son seropositivas para VON, pero la etiología de sus signos clínicos (por ejemplo ceguera en búhos) permanece desconocida (Komar, 2005).

Según estudios generales e histopatológicos se ha logrado describir la patogénesis natural de la infección aguda, fatal de VON en aves de 14 especies, representando ocho órdenes. Los síntomas descritos son: hemorragia cerebral, esplenomegalia, meningoencefalitis y miocarditis. Se observó daño a células de diversos tejidos. Las células de Purkinje fueron un blanco de infección muy recurrente excepto en córvidos. La causa de la muerte en la mayoría de estas aves es probablemente un colapso en las funciones de órganos múltiples (Komar, 2005).

Para comprender más el papel de las aves en el ciclo de mantenimiento y amplificación viral, así como el proceso de infección de VON, en 2003 Komar *et al.*, realizaron un estudio en el que se expuso individuos de 25 especies de aves que representaban un amplio rango de órdenes y familias de aves, a picaduras de mosquitos infectados. Se observó particularmente en aves del Orden Passeriforme, signos de enfermedad notorios (especialmente en córvidos). En la mayoría de casos, los signos clínicos fueron seguidos por muerte en 24 horas. De las especies evaluadas, se logró establecer que *Cyanocitta cristata* (azulejo o chara azul), *Quiscalus quiscula*, *Corvus brachyrhynchos* y *Passer domesticus* (Gorrión doméstico) actúan como reservorios competentes, sosteniendo un nivel de viremia mayor a $10^{5.0}$ UFP/mL, por lo que se les consideró capaces de infectar a *C. pipiens* y *C. quinquefasciatus* (Komar *et al.*, 2003). Es importante mencionar que en 2003 Estrada-Franco *et al.*, reportaron el aislamiento de VON en un Cuervo común en el estado de Tabasco, México.

Por aparte el estudio permitió determinar la existencia de transmisión oral en *Bubo virginianus* (Búho cornudo), *Corvus brachyrhynchos* (Cuervo americano), *Quiscalus quiscula* (Zanate común) entre otros (Komar *et al.*, 2003).

Este hecho representa un riesgo para córvidos, raptores y otras aves que se alimentan de carroña, así como predadores de animales enfermos o muertos. (Peterson *et al.*, 2004).

11. Monitoreo en aves centinela. El monitoreo en vertebrados hospederos se lleva a cabo para obtener información cualitativa y cuantitativa sobre la presencia, distribución, intensidad y fluctuaciones en la actividad del VON (McLean *et al.*, 2002).

Se puede obtener información evaluando especímenes que se hallan involucrados en otro estudio, con propósitos distintos (sistema pasivo) o bien colectando y evaluando especímenes capturados u obtenidos mediante un programa de monitoreo (monitoreo activo). El tipo o tipos de monitoreo depende de la localización geográfica, condiciones del ambiente, ecología, el virus y el hospedero involucrado, recursos y experiencia del personal. Para todo tipo de monitoreo se requiere de especies que sean usualmente picadas por el mosquito vector y que adquieran la infección cuando sean expuestas al virus (McLean *et al.*, 2002).

El monitoreo activo en aves vivas, libres o cautivas se emplea para detectar la presencia del VON y dar seguimiento por temporadas o anualmente a la actividad viral. Las especies adecuadas para ser centinelas de vida libre requerirían no ser afectadas mortalmente ante la infección viral además de desarrollar niveles detectables de anticuerpos. La utilización de aves sedentarias abundantes y ampliamente distribuidas representa una mejor opción para comparar los datos entre sitios de muestreo respecto a lo que se obtendría empleando aves silvestres (McLean *et al.*, 2002). Hasta el momento se considera que el monitoreo y vigilancia de la actividad de VON en zonas de elevada población y buenas vías de comunicación se realiza de forma más efectiva registrando la mortandad en aves. Esto se debe a los niveles dramáticos de morbilidad e índices de muerte en aves, registrados principalmente en *Corvus* spp. en Norteamérica (Peterson *et al.*, 2004).

La elección de una especie de aves centinela cautiva debe considerar el hecho que sea fácil de manipular y que sea robusta para soportar la manipulación y la toma de muestras de sangre periódicas, además de no ser afectadas mortalmente por la infección y desarrollar anticuerpos. Es muy importante que los niveles de viremia que estas aves alcancen sean insuficientes para infectar a otros vectores, y que tampoco esparzan el virus, en sus heces por ejemplo, puesto que esto representaría un riesgo para quienes las manipulen. Un factor importante establecer una red de monitoreo con aves centinelas cautivas es la facilidad para comprarlas, criarlas, mantenerlas, manipularlas y sangrarlas. Las ventajas que el uso de este tipo de centinelas aporta al monitoreo del VON son: los mosquitos se alimentan ávidamente de estas aves, es fácil tomar muestras de sangre periódicamente, se conoce la localidad donde se adquiere la infección, el número de centinelas y localidades de trabajo se adapta a las necesidades del estudio, y la colecta y procesamiento de las muestras es relativamente barato. Las desventajas de este tipo de monitoreo incluyen: la necesidad de mantener grupos de aves, protegerlos de predadores, vandalismo y robo. Adicionalmente estas poblaciones centinelas únicamente detectan la presencia del virus en su área (transmisión focal), por lo que se requeriría de múltiples grupos para detectar la actividad viral en área amplia. Una alternativa es combinar el uso de poblaciones centinela con la captura y toma de muestras de aves silvestres residentes en la misma área. No existe un candidato ideal para ave centinela en el monitoreo viral

pero uno de los candidatos principales son las gallinas. Una especie ideal debe ser susceptible a la infección al ser expuesta al VON, desarrollar anticuerpos detectables, no presentar viremias elevadas y no representar riesgo de infección a quien la manipule (McLean *et al.*, 2002).

El monitoreo involucra tomas periódicas de muestras de sangre, las cuales se centrifugan para separar el suero. El suero puede analizarse luego por un Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA por sus siglas en inglés), y los resultados positivos se confirman posteriormente por pruebas de neutralización, para descartar falsos positivos y reacciones cruzadas con los anticuerpos empleados para la detección, debido a infecciones por flavivirus relacionados como VESL (McLean *et al.*, 2002).

A pesar que los resultados experimentales indican que las gallinas son candidatos adecuados para el monitoreo de VON como aves centinela, su uso en los Estados Unidos, durante el monitoreo en el año 2000 tuvo un éxito limitado. Esto se debió a que solamente se registró 13 seroconversiones en Nueva York y Nueva Jersey a pesar de la intensa transmisión en aves silvestres, y se obtuvo resultados positivos únicamente después de que ocurrieran casos humanos (McLean *et al.*, 2002).

12. Prevención y control. Como sucede con otras infecciones arbovirales, el control y prevención del VON puede alcanzarse mediante los siguientes pasos: (1) Medidas de precaución publicas para reducir la exposición. (2) Control de vectores (3) Uso de vacunas para proteger a hospederos susceptibles, reduciendo la transmisión del virus (McLean *et al.*, 2002).

a. La educación pública sobre el VON debe conducir a las poblaciones humanas a conocer el sistema en que se transmite y tomar medidas para reducir su exposición al virus. Esto se alcanza iniciando por medidas muy simples como la reducción de las poblaciones de mosquitos eliminando criaderos potenciales (aguas estancadas en cubetas, llantas y otros contenedores), protegiéndose a sí mismos, como a sus animales domésticos de la picadura de potenciales vectores utilizando repelentes (que contengan DEET: N,N-dietil-m-toluamida, como ingrediente activo) y evitando salir a la intemperie en horas del amanecer y atardecer, horas pico de alimentación de mosquitos (McLean *et al.*, 2002).

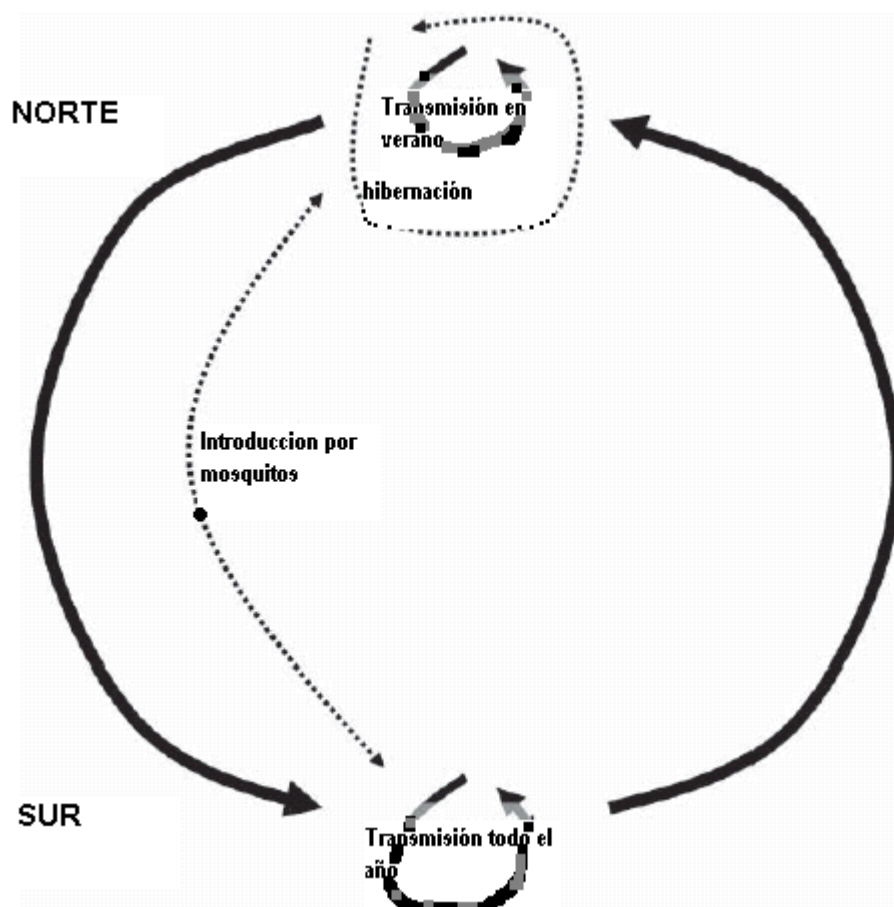
b. Los principales vectores de VON son especies de mosquitos. El control de estos vectores requiere de programas integrados que contemplen la reducción o alteración de hábitats potenciales de larvas, tanto a pequeña escala (jardines y terrenos privados) como zonas cenagosas. Se recomienda el control químico de larvas y adultos dando seguimiento al desarrollo de resistencia (McLean *et al.*, 2002).

c. No existe una vacuna para humanos, aunque sí se están realizando estudios. Sin embargo, debido a que el virus no presenta una incidencia muy amplia en humanos, en la mayoría de áreas, esta vacuna no presenta un buen balance costo-efecto, en caso de su uso en programas de salud pública. En los Estados Unidos, el Departamento de Agricultura aprobó parcialmente en 2001, el uso de una vacuna para equinos empleando VON muerto (McLean *et al.*, 2002). Se ha logrado inmunización vacunando con la proteína E o NS1 purificadas, sin embargo se obtuvo una respuesta inmune más fuerte luego de la expresión del polipéptido: C-prM-NS1-NS2A empleando vacunas recombinantes. Actualmente se desarrollan vacunas de ADN que expresen las proteínas pr-M-E o C del VON, una vacuna de VON atenuado, así como una vacuna compuesta por un virus quimérico atenuado que consiste en sustituir los genes del Virus de Fiebre Amarilla de la vacuna 17D, que codifican para pr-M y E, con los genes de VON para estos mismos productos (Brinton, 2002).

13. Progresión del virus, implicaciones respecto a las aves en peligro de extinción. Los ciclos de transmisión locales del VON en las áreas tropical y templada pueden hallarse vinculados por la migración de aves, según se sospecha. Se cree que en los trópicos, las comunidades de mosquitos y de aves mantienen un ciclo de transmisión local permanente. En la primavera, la migración de las aves transporta el virus hacia el norte, permitiendo la ocurrencia de brotes esporádicos de VON en las regiones templadas. Esta interacción se muestra en la figura 8. De ser cierto la implicación de las aves migratorias en la introducción del VON en las regiones del sur del continente americano, la dispersión del virus a través del neotrópico debería seguir un patrón similar al de la ruta de migración de las aves. De no ser así la movilización del virus podría deberse a la introducción de mosquitos llevados a cada sitio por transportes humanos. Esto implicaría un patrón de dispersión muy distinto. En 2003 Peterson *et al.* simularon el esparcimiento

del VON en el este de los Estados Unidos, considerando los nichos ecológicos de tres especies de mosquito *Culex*. Los escenarios de dispersión viral se trabajaron considerando y eliminando de la simulación a 41 especies de aves migratorias. Únicamente se recreo la dispersión real del VON en esta región al considerar en el modelo a la aves migratorias (Peterson *et al.*, 2004).

Debido al potencial de dispersión del VON por parte de aves migratorias, es imperante comprender las rutas de migración y las interacciones entre aves residentes y migratorias, para anticipar la dinámica espacial del VON (Peterson *et al.*, 2004).



(Peterson *et al.*, 2004)

Fig. 8. Aspectos geográficos del ciclo de transmisión del VON. Las líneas gruesas conectan al norte y al sur representando la migración aviar.

Los patrones de mortandad en aves silvestres, asociados a VON son muy amplios, según los estudios realizados para aves de Norteamérica. El VON a causado eliminaciones temporales, de algunas especies en algunas regiones, como el Cuervo americano en el este de Estados Unidos. A lo largo de todo el Hemisferio Occidental, existe un elevado número de especies en peligro o bajo amenaza, y/o pueden hallarse limitadas a una pequeña distribución geográfica. Estas especies se tornan especialmente vulnerables en caso de que el VON irrumpa en su nicho ecológico. Esto se debería a que un pequeño incremento en la tasa de mortandad, aunado a otros factores de estrés como la destrucción de su hábitat y su captura para venta como mascotas, puede incrementar el riesgo de extinción para las aproximadamente 80 especies en peligro en América (Peterson *et al.*, 2004).

C. Técnicas de detección moleculares y serológicas para el VON

1. RT-PCR en tiempo real. Durante los últimos diez años se han desarrollado varios ensayos de amplificación molecular para la detección de flavivirus. La mayoría de estos ensayos utilizan la técnica de Transcripción inversa, seguida de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR por sus siglas en inglés) para amplificar el genoma viral, detectando su presencia mediante la electroforesis en gel de agarosa y la tinción con bromuro de etidio o la hibridización de sondas moleculares (Lanciotti, 2003).

Todos los ensayos de amplificación molecular involucran tres etapas básicas: 1) extracción y purificación de ácidos nucleicos de las muestras a analizar 2) Amplificación del ácido nucleico. 3) detección y caracterización del producto amplificado. En el caso de los flavivirus, la primera etapa es la extracción del ARN, a partir de varias fuentes las cuales pueden incluir Líquido Cefalorraquídeo, macerado de mosquitos homogeneizado, así como macerados de pulgas o tejidos. Los ensayos moleculares más comunes para la detección ARN viral en muestras se basan en la RT-PCR en formato estándar la cual involucra dos etapas: 1) transcripción inversa del ARN sh (+) genómico viral generando una hebra simple de ADN de copia (cDNA por sus siglas en inglés). 2) conversión a ADN de doble hebra (dsDNA por sus siglas en inglés) para luego dar paso a la amplificación de

este dsDNA por PCR empleando Taq Polimerasa. . Luego de la amplificación por RT-PCR, se debe utilizar algún método de detección para determinar si la amplificación del producto deseado ocurrió. El método más empleado es la determinación del tamaño del producto de amplificación por electroforesis en gel de agarosa, visualizando el producto por tinción con bromuro de etidio. Un método más reciente de detección implica el uso de un agente de tinción que se une al ADN cuya fluorescencia incrementa al unirse éste al ADN, el método se conoce como Taq Man® RT-PCR (Lanciotti, 2003).

Los avances más recientes en los métodos de amplificación, registran grandes beneficios en términos de sensibilidad y especificidad en la detección de virus. Estos ensayos combinan la amplificación por RT-PCR con sondas específicas para una región del genoma viral. Estas sondas se hallan marcadas con moléculas fluorescentes, las cuales permiten detectar la amplificación del material genómico durante la misma reacción de amplificación. Estos ensayos ofrecen una serie de ventajas sobre los ensayos tradicionales de RT-PCR, como lo son mayor sensibilidad, especificidad, cuantificación y respuesta analítica veloz (Lanciotti, 2003).

2. Ensayo de ELISA. La prueba de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) es un ensayo de unión directa de anticuerpos (o antígenos), en el que se requiere de una preparación pura de antígeno o anticuerpo para estandarizar la prueba. Generalmente, la prueba se desarrolla analizando muestras para la detección de antígenos, los cuales se fijan en los pozos de una placa para ELISA. El antígeno se fija a la superficie plástica del pozo, de forma inespecífica. Para evitar falsos positivos, se bloquea los sitios remanentes en el pozo, empleando proteínas irrelevantes. La presencia del antígeno se detecta añadiendo un anticuerpo específico, el cual se halla ligado a una enzima. Si el antígeno se hallaba en la muestra se dará una unión específica entre ambos elementos. Luego se lava la placa para eliminar los anticuerpos que no se unieron. La fase de detección se basa en un cambio de color dependiente de la enzima ligada, siendo este cambio de coloración directamente percibido en la placa de reacción lo cual facilita la recolección de resultados (Janeway *et al.*, 2001).

Pese a que la Prueba de reducción de placas por neutralización (PRNT por sus siglas en inglés) es el estándar de oro para la detección de serológica de arbovirus, la

misma se considera un ensayo difícil de implementar debido a la imposibilidad de que se aplique en varios laboratorios de diagnóstico, por varias razones: Usualmente requiere un área de trabajo con un nivel de bioseguridad elevado. Representa una alta inversión en tiempo, trabajo y equipo. Se necesita de personal especializado para elaborarla. Debido a esto el desarrollo de una prueba serológica rápida, permitiría el tamizaje inicial y monitoreo de varias muestras, con un bajo riesgo en términos de bioseguridad. Esto permitiría su implementación en proyectos de monitoreo serológico a gran escala, basados en muestras de aves, para la vigilancia ecológica del VON (Ebel *et al.*, 2002).

El brote de VON en Norteamérica en el año de 1999 generó una alta mortandad en aves, particularmente en cuervos. El diagnóstico de infecciones por VON en aves es complicado por la presencia de otros flavivirus en el área. Se conoce la estrecha relación antigénica y genética del VESL con el VON, además éste se mantiene en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión similar y ha sido aislado en aves silvestres. El VESL ha sido responsable de dos brotes considerables en Centro América y otros brotes esporádicos en Sur América. (Blitvich *et al.*, 2003).

La mayoría de anticuerpos producidos por hospederos con una infección ocasionada por flavivirus son dirigidos contra los epítomos en las proteínas E, NS1 y NS3, aunque anticuerpos contra otras proteínas virales también han sido detectados (Brinton, 2002).

Los ensayos de ELISA directo constituyen un método rápido, sensible y de bajo costo para la detección de anticuerpos contra VON en suero de aves. Sin embargo esta técnica no es la indicada en el caso de que se este tamizando un amplio grupo de sueros de aves pertenecientes a distintas especies, debido a que esto requeriría varios anticuerpos reporteros secundarios según la especie analizada. Una alternativa es el ensayo de ELISA de bloqueo de epítomo, el cual no requiere de múltiples anticuerpos reporteros o de captura, y además se ha reportado como un método efectivo para detectar, específicamente infecciones en gallinas centinela, ocasionadas por virus Kunjin. El ensayo de ELISA de bloqueo registró niveles elevados de sensibilidad, sin embargo no se halló ninguna relación entre los valores de porcentaje de inhibición y los títulos de PRNT realizados como prueba confirmatoria. Esto no fue algo inesperado debido a que estos dos ensayos no detectan, necesariamente la misma clase de anticuerpos. Los ensayos de

bloqueo pueden detectar anticuerpos no neutralizantes. Se determinó que el ELISA de bloqueo presenta mayor sensibilidad que el PRNT al analizar muestras colectadas 14 días postinfección. Pese a esto se debe resaltar que los anticuerpos neutralizantes presentan mayor longevidad. Por ello es probable que las pruebas de ELISA de bloqueo no presenten mayor sensibilidad que el PRNT al emplearse para analizar muestras de suero de aves capturadas durante trabajo de campo (Blitvich *et al.*, 2003).

El desarrollo del ensayo de ELISA de bloqueo para monitoreo de VON permitió determinar el uso del anticuerpo monoclonal 3.1112G, que reconoce un epítipo en la proteína viral NS1, para identificar específicamente una infección por VON, siendo capaz de distinguir entre VON y casos de VESL (Blitvich *et al.*, 2003). La metodología de ELISA de bloqueo se explica en la figura 9.

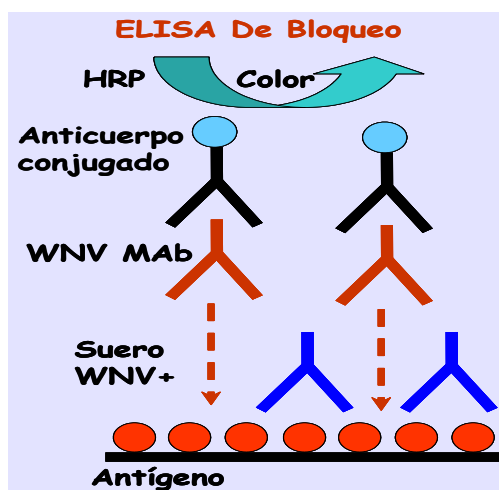


Fig 9. Diagrama de un ELISA de bloqueo. (Morales, 2005)

Este ensayo consiste en la detección de anticuerpos contra antígenos específicos de VON, producidos por inoculación del VON en células ATC-15. El proceso inicia fijando el antígeno al fondo de la placa de ELISA y su exposición al suero de cada una de las aves o individuos analizados. De haber anticuerpos específicos contra VON en el suero del individuo se bloquea la unión de los anticuerpos monoclonales, 3.1112G. De ser este el caso, el anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés) no se une al anticuerpo monoclonal y no se desarrolla color al adicionar el sustrato para la

reacción. De no haber anticuerpos contra VON en el suero del individuo, se desarrolla un intenso color verde como se observa en la Figura 10.

La determinación de la presencia de anticuerpos contra VON en la muestra se realiza calculando el porcentaje de inhibición que ejercen los mismos, sobre el reconocimiento del antígeno de VON por el anticuerpo monoclonal 31112g. El bloqueo ejercido por los anticuerpos en la muestra se percibe en base a la intensidad del color en cada pozo de la placa donde se colocó muestras. Específicamente, la interpretación requiere de la comparación entre la densidad óptica (D.O) de la muestra y del suero control a 415nm. La lectura espectrofotométrica empleada es aquella en la que la D.O del control negativo excede 0.3 unidades de absorbancia. En ese momento las muestras cuya lectura sobrepase el punto de corte (criterio de diagnóstico) equivalente a un porcentaje de inhibición $\geq 30\%$, se consideran positivas para presencia de anticuerpos contra VON.

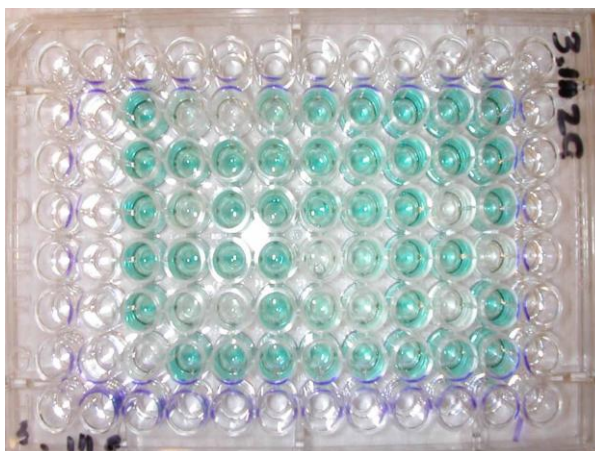


Fig 10. Fotografía de una placa de prueba de ELISA de bloqueo. (Morales, 2004).

Las pruebas de ELISA permiten analizar una gran cantidad de muestras, si embargo no son, generalmente tan sensibles como los ensayos de aislamiento viral en cultivo celular (Lanciotti, 2003).

3. PRNT. El estándar de oro para la detección serológica del VON es el ensayo de Reducción de Placas por Neutralización (PRNT por sus siglas en inglés) el cual permite

determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra antígenos virales. Este ensayo fue descrito por Beaty, *et al.* en 1995 y consiste en: se prepara una dilución de los sueros por un factor de $\frac{1}{2}$. Se añade 0.1 ml de la misma a un equivalente en volumen de una dilución del virus con 200 PFU (unidades formadoras de placa por sus siglas en inglés). Esta mezcla se incuba a 37° por 1 hr o a 4° durante una noche. Luego se toma 0.1ml de la mezcla y se inocula sobre la superficie de un cultivo celular. El cultivo, en movimiento, se incuba entre 28-37° por 45 min. El cultivo se cubre con un medio que contenga 1% agar y se observa diariamente por si aparecen parches o placas. Se incluyen controles con virus mezclado con suero normal, virus con suero inmune, y control de reactivos (diluyente). El ensayo finaliza cuando el conteo de PFU alcanza las 100 PFU. A menor número de placas contadas, es mayor el grado de neutralización en el suero analizado. Se considera positiva la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero, cuando se da una reducción en el conteo de placas de 50% comparado con el control (Lennette *et al.*, 1995).

D. Migración de aves. Las aves neárticas cuya ruta de migración pasa por México y Centro América llevan a cabo una migración de larga distancia, es decir aves que regularmente viajan distancias considerables entre su sitio de crianza y su sitio de residencia habitual. Estas migraciones se orientan generalmente de norte a sur e incluyen a las aves que son visitantes de invierno, residentes durante el verano, y los emigrantes transitorios. En caso de aves residentes del área, sus migraciones se denominan locales, puesto que recorren distancias cortas, en rutas menos predecibles o regulares, e incluyen las migraciones por altitud, el retiro por temporada de las zonas periféricas de crianza, y la dispersión post-crianza (Howell, 2001).

E. Descripción de la Zona de Estudio. La distribución de las aves se relaciona básicamente al hábitat. Algunas aves son específicas para un hábitat, otras tienen una amplia tolerancia respecto a este factor, y otras presentan una adaptabilidad notoria. Los requerimientos principales para un hábitat son alimento, refugio, y en el caso de aves residentes, sitios para anidar y materiales para el nido. (Howell, 2001).

1. Punta de Manabique. Punta de Manabique se encuentra en la costa caribeña de Guatemala, en el departamento de Izabal, entre los paralelos 15° 40' y 16° 00' Norte y los meridianos 88° 13' y 88° 44'. Fue declarada como Refugio de Vida Silvestre por el Decreto 23-2005 (Ley de Áreas Protegidas). La superficie del área es de aproximadamente 1,329.00 Km² incluyendo la zona terrestre, las aguas interiores y la zona marina. Comprende un paisaje marino de aguas someras no muy cálidas y de baja salinidad que se complementa con una porción terrestre formada por un banco arenoso que resguarda una franja de pantanos, en la que se desarrolla un bosque sobre terrenos anegadizos, con agua dulce.

La figura 11 es una fotografía de la playa de Punta de Manabique, en la que se instalaron redes de niebla para captura de aves. El humedal es un refugio para vida silvestre, particularmente para aves y mamíferos amenazados a nivel nacional (FUNDARY-ONCA, 2001).



Fig 11. Playa de Punta de Manabique.

(Martínez, 2005)

Las tierras costeras son zonas secas en el margen terrestre, caracterizadas por franjas de vegetación definidas entre la marea más alta y las tierras interiores. La primera franja la forman los pastizales. Constituye un lugar con plantas básicamente herbáceas. La siguiente franja es una comunidad dominada por icaco (*Chyisobalanus icaco*). La tercera franja es una comunidad donde es característico el tarillo asociado al platanillo. Los bosques tropicales sometidos a inundaciones, representan más del 50% de la sección terrestre. Son dominados por palma de confra, además de palo sangre o cáhue, barillo, zapote bobo y San Juan (FUNDARY-ONCA, 2001).

Actualmente están registradas 323 especies de aves. Las familias de mosqueros (Tyrannidae), chipes, garzas (Ardeidae), Icteridae, halcones (Accipitridae) y Scolopacidae forman el grupo con mayor riqueza de especies, representan más de la tercera parte de las especies registradas. Una de las razones para la alta diversidad de especies en Punta de Manabique es la diversidad de hábitats.

Es notable la presencia de aves migratorias neárticas. Las 118 especies que se reúnen en el 29% de aves playeras y marítimas, reflejan que Punta de Manabique es un nexo importante entre los hábitats terrestres y marítimos, así como entre los hábitats del Neártico y del Neotrópico. Manabique es el sitio con mayor número de migratorias registradas para Guatemala. De las 323 especies, 37 se hallan en los apéndices de CITES y 59 se localizan en la Lista Roja Nacional. En Manabique se halla reportada la presencia del loro cabeziamarillo (*Amazona oratrix belizensis*), clasificado como en peligro de extinción en el listado mundial de las especies amenazadas. La única zona núcleo de reproducción de este loro en Guatemala está situada en el Sureste de Punta de Manabique (FUNDARY-ONCA, 2001).

En Punta de Manabique predominan las enfermedades intestinales, respiratorias, paludismo, dengue e infecciones de la piel. No existen los servicios básicos de un puesto de salud en el área, que evitaría los problemas de transporte de los enfermos y otros casos médicos a Puerto Barrios (FUNDARY-ONCA, 2001).

2. Machacas del Mar. La finca Machacas del Mar se sitúa en el municipio de Puerto Barrios, Izabal. La actividad ganadera bovina predomina en el área. Esto se

observa en la figura 12. Se puede considerar que la vegetación es mayoritariamente crecimiento secundario, con arbustos y árboles pequeños, muchos de ellos frutales. Existen pocos árboles de altura prominente y hay varios claros. Los linderos del bosque, especialmente los alterados por el hombre, proveen de nuevos hábitats a especies que se hallaban restringidas naturalmente a esa zona.



Fig 12. Ganado bovino en la finca Machacas del mar. (Martínez, 2005)



Fig 13. Área verde del Instituto Luis Pasteur, Puerto Barrios. (Martínez, 2005)

3. Ciudad de Puerto Barrios. El Instituto Experimental Luis Pasteur, se localiza en la ciudad de Puerto Barrios, Izabal. Es un sitio urbano, situado a poca distancia de la costa atlántica. Es un área verde cercada caracterizada por la presencia de árboles frutales, crecimiento secundario, arbustos y drenajes expuestos. Esto se muestra en la figura 13.

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que el VON, agente de la encefalitis del Oeste del Nilo, afecta a 198 aves neárticas (Komar, 2005). Muchas de ellas transitan por nuestro país en su ruta de migración y podrían introducir el virus en poblaciones de aves residentes. Se estima que en una zona de alta densidad de aves migratorias podría haber una elevada introducción del virus en el ecosistema, sin embargo su amplificación en poblaciones de aves residentes se reduce debido al elevado número de aves transitorias que se hallan estacionalmente en el punto de introducción. Sin embargo la llegada del virus a un sitio de baja densidad de aves migratorias podría generar su amplificación elevada en las poblaciones residentes (este aspecto de la ecología del VON es aún una hipótesis) generando una epizootia que podría alcanzar a hospedero tangenciales como caballos y/o bovinos cuya importancia económica en nuestro país, es considerable. Además en un área selvática, el virus podría hallar otros reservorios, los cuales pueden dispersarlo y llevarlo a áreas pobladas por el hombre, en el cual ya se reportado morbilidad y mortandad asociada a VON

En nuestro país no existe una red de vigilancia para VON. Se ha reportado evidencia serológica en aves, en El Salvador, México y El Caribe. En México también ya se logró un aislamiento viral. Por ello la importancia de aportar datos basales sobre la circulación del VON en Guatemala es importante, para colaborar con la vigilancia de esta arbovirosis en el futuro. El departamento de Izabal es un sitio adecuado para realizar un monitoreo del VON debido a que es un punto de paso en la ruta de las aves migratorias y en el que se ha reportado 323 especies de aves, de las que 37 se hallan en el listado de aves protegidas. Los resultados que se obtendrían al realizar un monitoreo serológico, en poblaciones de aves residentes silvestres y domesticas, en la región caribe de Guatemala aportarían conocimiento sobre el ciclo en la naturaleza del VON en regiones tropicales de América. Estos datos, permitirían en un futuro, evaluar los riesgos de la introducción del VON en áreas donde los reservorios naturales interaccionan con hospedero tangenciales cuya importancia para las comunidades de la zona es alta. Además aporta criterios para el diseño de la red de vigilancia y prevención del VON por parte de las autoridades

pertinentes, debido a que los resultados serológicos pueden dar indicios de sitios geográficos donde podría hallarse posibles focos de transmisión de VON.

En Guatemala no se ha implementado un ensayo para el análisis de casos sospechosos de VON en aves. La implementación de la prueba de ELISA de bloqueo como ensayo base para el tamizaje inicial de las mismas es una opción viable, si se logra validar la capacidad de diagnóstico.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Hallar evidencia serológica de la presencia del VON en muestras de aves residentes silvestres y domésticas, tomadas en tres sitios de Izabal.

2. Objetivos específicos

- a. Determinar la proporción de aves migratorias a residentes en los tres sitios de estudio, para evaluar si el mismo varía para cada sitio durante cuatro épocas de migración de las aves.
- b. Determinar la seropositividad de anticuerpos para VON en aves silvestres y domésticas residentes, en tres sitios de la zona costera del Departamento de Izabal.
- c. Establecer si la seropositividad en aves residentes silvestres y domésticas, guarda relación con el porcentaje de aves migratorias registrado para cada sitio.
- d. Validar, preliminarmente, la prueba de ELISA de Bloqueo en base a la confirmación de resultados por el ensayo de PRNT para sustentar su aplicación como prueba de diagnóstico para VON en Guatemala.

V. HIPÓTESIS

El Virus del Oeste del Nilo circula en aves residentes, silvestres y domésticas, de la región caribe de Guatemala.

Existe diferentes proporciones de aves migratorias a residentes según el sitio y época de estudio.

Existe una relación inversa entre la seropositividad a VON y la proporción de aves migratorias a residentes.

VI. METODOLOGÍA

A. Métodos

Se tomó muestras de sangre de aves silvestres y domésticas residentes, en tres sitios del Departamento de Izabal, que presentan posibles diferencias en la densidad de aves migratorias. Este muestreo se realizó en cuatro distintas estaciones de migración de aves neárticas, en un año. Las aves silvestres se capturaron empleando redes de niebla, y se les colocó una banda plástica o metálica en la pata, según el grosor de la misma. Se tomó una muestra de sangre cuyo volumen correspondió al 1% del peso del ave. La muestra de sangre de aves domésticas se tomó en casas de personas residentes de la zona de trabajo. Se separó el suero de las muestras de sangre y las mismas se almacenaron en hielo seco. Luego se transportaron al laboratorio de Arbovirología de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG), donde se almacenaron a -20° . El ensayo serológico de ELISA de bloqueo se aplicó a las muestras, y los resultados obtenidos se almacenaron en la base de datos ARBOepi-Aves y Mosquitos empleada en el proyecto de Ecología del VON de la UVG. El porcentaje de aves migratorias en cada sitio se determinó por dos metodologías: censo de aves por transectos en cada sitio, y captura de aves en redes de niebla. Estos se realizaron en cada una de las visitas. Se determinó la incidencia de anticuerpos contra VON en el total de muestras tomadas para cada uno de los sitios. Esta determinación se hizo para cada una de las estaciones en que se trabajó. Mediante una prueba de ANOVA, se determinó si las diferencias observadas en el porcentaje normalizado de aves migratorias entre cada sitio, y durante cada una de las épocas, eran significativas. Se verificó la existencia de la correlación entre la incidencia de anticuerpos contra VON y porcentaje de aves migratorias registrados. Se confirmó, por PRNT, los resultados de la prueba de ELISA de bloqueo, enviando un grupo de muestras procesadas al Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés). Se determinó la especificidad y sensibilidad de la prueba de ELISA de bloqueo, según los resultados obtenidos a partir del PRNT.

1. **Sitios de trabajo y estaciones para tomar muestras.** Se tomó muestras de sangre de aves, en tres sitios del Municipio de Puerto Barrios, Departamento de Izabal. Estos

sitios difieren, posiblemente, en términos de densidad de aves migratorias registradas en el área, según estudios de la Fundación Mario Dary, (FUNDARY). También existe diferencias de hábitat y urbanización en los 3 sitios (Fundary-ONCA, 2001).

El sitio número uno fue el área protegida de Punta de Manabique, un humedal ubicado en zona costera y en teoría con una densidad elevada de aves migratorias. El área de trabajo se halla a una longitud N 15° 30.049', latitud W 88° 49.591' y 5 m de altitud. 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.

El sitio número dos fue la Finca Machacas del Mar, localizada a una longitud W 88° 32.157', latitud N 15° 45.772' y 9m de altitud. Ésta se caracteriza por ser una zona rural de bosque secundario y de actividad ganadera. En este sitio también se ha descrito la presencia de aves migratorias. En principio, estas se encuentran en menor cantidad en este sitio con respecto al sitio 1, Punta de Manabique; en mayor cantidad con respecto al sitio 3, ciudad de Puerto Barrios.

Finalmente, el sitio tres fue el Instituto Luis Pasteur, ubicado en la ciudad de Puerto Barrios, localizado a una longitud W 88° 35.764', latitud N 15° 43.512' y 12m de altitud, caracterizado por ser una zona urbana costera. Se considera a este sitio como el que posee la menor densidad de aves migratorias.

Los viajes se hicieron en los meses de enero, marzo, junio y agosto de 2005. Estas épocas corresponden a distintas estaciones de migración de las aves neárticas como lo muestra el cuadro 1.

Época de migración	Mes	Estatus aves migratorias en el Municipio de Puerto Barrios
Invernal	enero	Estancia de ciertas aves migratorias en la zona
Migración pre-nupcial	abril	Paso de aves migratorias en dirección norte
Estival	junio	Ausencia de aves migratorias.
Migración post nupcial	agosto	Llegada de aves migratorias a la zona y paso de estas en dirección Sur

Cuadro 1. Relación entre meses de trabajo y la época de migración de las aves (según datos de Howell *et al.*, 2001).

2. **Captura de aves residentes silvestres y domésticas.** La captura de las aves silvestres se realizó empleando redes de niebla (Avinet®). Se colocó un máximo de 21 redes, cubriendo entre 175 a 205 metros, dependiendo de la disponibilidad geográfica y de la seguridad en cada hábitat de trabajo. En general, se trató de ubicar las redes en un corredor de vuelo para las aves del área.

Las redes se abrieron diariamente al amanecer (aproximadamente a las 5:00 AM) y permanecieron abiertas como máximo hasta las 11:00 AM. Se revisó las mismas cada 10-20 minutos dependiendo de: factores climáticos, éxito de la captura, etc. En cada sitio de trabajo, se capturó y tomó muestras de sangre durante dos días consecutivos. Las aves silvestres capturadas se guardaron temporalmente en bolsas de tela. Luego éstas se clasificaron, se les tomó los datos morfométricos y se determinó cuando esto fue posible su edad y sexo. Las aves migratorias y aves del listado CITES, se procesaron de la misma forma y luego se liberaron, sin ser muestreadas. Esto se debe a que las aves migratorias podrían haber estado en contacto con el VON en su trayectoria de migración, por ello si se detectara en ellas anticuerpos, no se podría reportar con certeza si la infección con VON ocurrió en Guatemala. Las aves residentes que no se hallaban en el listado de aves protegidas CITES, se pesaron para estimar el volumen de sangre a tomar. Todos los datos obtenidos fueron registrados en una boleta de campo (ver Apéndice A: “Boleta de datos de campo.”). Las aves domésticas residentes, generalmente fueron gallinas (*Gallus gallus*) pertenecientes a personas que habitan cerca de los sitios de trabajo. Se incluyó en el estudio otras aves de corral como pijijes (*Dendrocygna autumnalis*).

3. **Determinación del porcentaje de aves migratorias en cada sitio.** Con el fin de determinar el porcentaje de aves migratorias versus residentes en cada sitio de estudio, se utilizó dos metodologías. Una de éstas fue el conteo de aves migratorias y residentes capturadas en las redes. La información de las redes se registró en la boleta de campo. La otra, consistió en realizar censos por dos ornitólogos especializados. Los censos de aves fueron hechos según la metodología de puntos de conteo durante cada uno de los viajes de campo. Se hicieron cinco (5) transectos diferentes, en micro-hábitats diferentes, dentro de cada sitio de estudio (Punta de Manabique, Machacas del Mar y Puerto Barrios). Los conteos se llevaron a cabo entre las 6 y las 9 a.m. durante 30 minutos por transecto. En el

período de 30 minutos se caminó a lo largo del transecto contando durante 3 minutos las aves vistas y escuchadas; se hizo una pausa de un minuto durante la cual se siguió contabilizando y luego se continuó el conteo marchando por 3 minutos y así sucesivamente. Los datos de censos fueron registrados en una base de datos.

4. Toma de muestra de sangre de las aves. Para las aves silvestres, se tomó como máximo un volumen correspondiente al 1% del peso del ave, lo que permite obtener la muestra sin riesgo para la vida y salud del animal. El volumen mínimo de muestra necesario para poder elaborar los ensayos serológicos (ELISA y PRNT) corresponde a 0.3 mL por lo que de no poder sacarse esta cantidad, el ave fue liberada sin ser muestreada. Para tomar la sangre de la vena yugular o braquial del ave se empleó jeringas de 1 cc con aguja No. 26 o 27 (Beckton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos). La muestra se almacenó en tubos Microtainer[®] (Becton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos) dejándolos reposar, por al menos, 30 minutos a temperatura ambiente para que se separara el suero. Se indujo el proceso de separación por inversión del tubo, de 8 a 10 veces. Luego se centrifugó las muestras a 3000 RPM por 10-20 minutos para separar el tejido sanguíneo. Cada tubo se conservó en hielo seco, hasta su posterior almacenamiento en el laboratorio de la UVG a -20°C. Para las aves domésticas, las muestras de sangre se tomaron de la vena braquial o de la yugular y se procesaron de igual forma que para las aves silvestres.

5. Identificación de las muestras. Las muestras de aves se identificaron mediante un sistema alfanumérico. Se colocó la letra “A” indicando su identidad como ave, y se asignó luego un número a cada uno de los sitios de muestreo (A001, A002...) por fecha de trabajo. A cada individuo muestreado se le asignó un número correlativo para indicar el orden en que se tomó la muestra en cada sitio (A001-01, A001-02...) Este sistema permitió identificar a cada individuo según el sitio al que pertenece, y la fecha en la que se muestreo. Con ello se dio seguimiento a su historia serológica durante el estudio.

6. Almacenamiento de información de las muestras y datos de campo. Las muestras obtenidas se registraron en la base de datos de Microsoft Access “*Muestras*” con

la que se llevó el control de los ingresos y de la ubicación de las muestras en el laboratorio de Arbovirología de la UVG.

Por otro lado, se utilizó una segunda base de datos “ARBO-epi aves y mosquitos” en Microsoft Access para registrar la información de las aves muestreadas, tanto silvestres como domésticas. Se registraron datos sobre ubicación y fecha de muestreo, así como información de cada ave muestreada, incluyendo especie, edad, sexo, parámetros individuales como tamaño de alas, pico y cola, además de peso. Se registró también el tipo y número o color de banda utilizada para la identificación del ave, con el objeto de reconocerla en caso de ser recapturada.

7. **ELISA de bloqueo.** Se siguió el protocolo reportado por Blitvich, *et al* en 2002. Únicamente se emplearon los 60 pozos internos de una placa para ELISA con pozos de fondo plano Costar® (Corning Incorporated, Nueva York, Estados Unidos). La distribución de muestras y controles en la placa fue la que se muestra en la figura 14.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
B	N	C(-)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	C(-)	N
C	N	C(-)	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	C(-)	N
D	N	Blanco	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	Blanco	N
E	N	C(+)	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	C(+)	N
F	N	C(+)	M33	M34	M35	M36	M37	M38	M39	M40	C(+)	N
G	N	M41	M42	M43	M44	M45	M46	M47	M48	M49	M50	N
H	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Fig 14. Mapa de placa para ELISA de bloqueo para diagnóstico serológico de VON. Donde se coloca controles negativos (C-), controles positivos (C+), blancos y muestras en orden correlativo.

Las soluciones preparadas antes de iniciar el ensayo son las siguientes: buffer para sensibilización del cual se preparó 1L consistente en Carbonato de Sodio 50mM, Bicarbonato de sodio 50mM a pH 9.6 almacenado a 4°; buffer de bloqueo del cual se preparó 200 mL, debido a que se debía utilizar una solución fresca cada 15 días. Éste consiste en una solución de PBS (a concentración final de 0.01M de Buffer de fosfato, 0.0027 M de cloruro de potasio y 0.137 M de cloruro de sodio), leche descremada Dos Pinos ® a concentración final de 5% y Tween 20® al 0.1% (Sigma, San Luis Missouri, Estados Unidos). La solución se ajustó a un pH de 7.4 a 25° y se almacenó a 4°; finalmente el buffer de lavado del cual se preparó 1L consistente en una solución de PBS (a concentración final de 0.01M de Buffer de fosfato, 0.0027 M de cloruro de potasio y 0.137 M de cloruro de sodio), y Tween 20® al 0.1% (Sigma, San Luis, Missouri, Estados Unidos). Esta solución se almacenó a temperatura ambiente.

Según el mapa propuesto, se colocó en la placa de ELISA 4 controles negativos, correspondientes a suero normal de gallina (División de Enfermedades Arbovirales, CDC Fort Collins, Colorado), 4 controles positivos, correspondientes a suero de caballo infectado con VON (División de Enfermedades Arbovirales, CDC Fort Collins, Colorado) y dos blancos constituidos por buffer de bloqueo para determinar la señal de fondo. Las muestras se colocaron en orden correlativo, procesándose 50 muestras por placa.

Inicialmente se sensibilizó los 60 pozos internos de la placa con 100uL del antígeno de VON diluido por un factor de 1/900 en buffer de sensibilización. El antígeno fue enviado por el Doctor Brad Blitvich de la Universidad Estatal de Colorado, y el mismo se preparó inoculando células ATC-15 obteniendo el antígeno por sonicación. La placa se incubó a 4° durante una noche. Al día siguiente se lavó la placa cuatro veces con buffer de lavado. Se bloqueó los 60 pozos empleados añadiendo 200 uL de buffer de bloqueo a cada pozo y se incubó la placa a 37° por al menos 40 minutos, o como máximo 3 horas. Luego de la incubación se descartó el buffer de bloqueo. Se añadió según el orden establecido en el mapa de la placa, 50 uL de una dilución (factor 1/10) en buffer de bloqueo de los sueros (controles negativos, positivos y muestras). En los pozos asignados para blanco se agregó 50uL de buffer de bloqueo. La placa se incubó a 37° por dos horas. Finalizada la incubación se lavó la placa cuatro veces con buffer de lavado. Se añadió a cada pozo, exceptuando en los pozos de blanco, 50 uL de una dilución 1/2000 en buffer

de bloqueo, del anticuerpo monoclonal* 3.1112G (1mg/mL). Éste es específico para el epítipo* NS1 de VON y Kunjin virus (Chemicon International, Temecula, California, Estados Unidos). En los pozos de blanco se añadió 50 uL de buffer de bloqueo. La placa se incubó a 37° por una hora. Luego de incubar, se lavó la placa cuatro veces con buffer de lavado. Se añadió a cada pozo, 50 uL de una dilución 1/2000, en buffer de bloqueo, del anticuerpo conjugado -conejo anti-ratón Ig G conjugado a Peroxidasa de Rabano- (Zymed Laboratories, San Francisco California, Estados Unidos). La placa se incubó a 37° por una hora. Finalizada la incubación se lavó la placa cuatro veces con buffer de lavado y se añadió a cada pozo 75 uL de la solución de revelado ABTS®, solución sustrato para peroxidasa ABTS y solución de peroxidasa B (KPL Laboratories, Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos). El ensayo finalizó tomando la lectura de la absorbancia a 415 nm, por intervalos de 5 minutos aproximadamente. Se detuvo la lectura cuando el promedio de absorbancia de los controles negativos excedió el valor de 0.3. Las lecturas se realizaron en un lector de placa de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, California, Estados Unidos) empleando el programa Soft Max Pro® (Molecular Devices, Sunnyvale, California, Estados Unidos) para la toma y procesamiento de los datos. Las lecturas se transfirieron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel para poder determinar el Porcentaje de inhibición. Este valor representa la proporción de anticuerpos contra VON presentes en el suero de la muestra. El porcentaje de inhibición se estimó según lo indicado en 2003 por Blitvich, *et al.*

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

Fórmula 1. Determinación del porcentaje de inhibición en ELISA de bloqueo.

Donde:

TS = Absorbancia de suero muestra desconocida.

CS = Absorbancia promedio de suero control negativo.

B = Absorbancia promedio de fondo o blanco.

La determinación del promedio de los controles negativos se hizo eliminando el valor más alto y más bajo registrado. Se promedió las lecturas intermedias. Se utilizó el

valor promedio de absorbancia de los dos blancos. El diagnóstico de la muestra se realizó según estos criterios:

$\geq 30\%$ de inhibición indica la presencia de anticuerpos VON.

15% - 30% de inhibición indica que la presencia de anticuerpos contra VON es dudosa.

$< 15\%$ de inhibición indica que la muestra es negativa para anticuerpos contra VON.

Para todas las muestras se siguió el protocolo antes indicado. Los resultados obtenidos se ingresaron en la base de datos en Microsoft Access, llamada ARBOepi-Aves y Mosquitos.

Se validó la concordancia de los resultados obtenidos por la prueba enviando 63 muestras procesadas al CDC (Fort Collins, Colorado). Se les realizó un análisis confirmatorio por PRNT. Los resultados de la prueba estándar, se compararon con los del ELISA de bloqueo.

8. Prueba de Reducción de Placas por Neutralización. El estándar de oro para la detección serológica de los flavivirus como VON, es el ensayo de Reducción de Placas por Neutralización (PRNT por sus siglas en inglés). Este ensayo requiere de laboratorios con medidas especiales de bioseguridad no disponibles en el Centro de Estudios en Salud de la UVG, por lo que fue realizado por colaboradores del proyecto en el CDC de Fort Collins, U.S.A. Con esta técnica se pudo determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra antígenos virales. Este ensayo fue descrito por Beaty, *et al.*, en 1995.

El ensayo inició con la preparación de diluciones seriadas (por un factor de $\frac{1}{2}$) de los sueros. Luego, se añadió 0.1 ml de cada dilución a un equivalente en volumen de una dilución del virus que contenía 200 unidades formadoras de placa (PFU por sus siglas en inglés). En nuestro caso se hizo la prueba tanto con VON como con el virus de la encefalitis de San Louis, que es el flavivirus más cercano a VON reportado en el continente americano. Esta mezcla se incubó a 37° por 1 hr o a 4° durante una noche. Luego se tomó 0.1ml de la mezcla y se inoculó sobre la superficie de un cultivo celular. El cultivo, en movimiento, se incubó entre $28-37^{\circ}$ por 45 min. Finalmente, se cubrió el cultivo con un medio que contenía 1% agar y se observó diariamente para ver si aparecen

parches o placas de lisis*. Se incluyó controles con virus mezclado con suero normal, virus con suero inmune, y control de reactivos (diluyente).

Al terminar el ensayo se realizó un conteo de las placas formadas en presencia de los sueros analizados y controles. El grado de disminución de las placas refleja el grado de neutralización provocada por los anticuerpos presentes en el suero analizado. Un resultado se consideró positivo cuando se observó una reducción en el conteo de placas del 90% comparado con el control (Lennette *et al.*, 1995).

En el caso de VON y SLE, un suero se consideró positivo para VON si su título es al menos 4 veces mayor al título observado con SLE e inversamente. Si los sueros son positivos con ambos virus, pero la diferencia no excede ese rango, se dice que el suero es positivo para un flavivirus no determinado.

9. **Análisis estadístico.** El objetivo del análisis estadístico fue, inicialmente determinar si había diferencias en el porcentaje de aves migratorias respecto a residentes en cada sitio y época de estudio; de existir diferencias se pretendía determinar si estas eran significativas. El primer paso consistió en normalizar los porcentajes de aves migratorias obtenidos aplicando la transformación de arcoseno $(\sin^{-1})^{2†}$, según Zar (1998):

$$\frac{1}{2} \left[\arcsin \sqrt{\frac{x}{n+1}} + \arcsin \sqrt{\frac{x+1}{n+1}} \right] \frac{180}{\pi}$$

Fórmula 2. Transformación de arcoseno.

Donde:

x= conteo de aves migratorias por censo o capturadas en red

n= conteo total de aves migratorias y residentes en censo o capturadas en red.

Posteriormente se aplicó una prueba de ANOVA de dos factores sin repetición. Se calculó la incidencia de anticuerpos contra VON en las aves residentes muestreadas, para

^{2†} La transformación de arcoseno convierte las proporciones en grados. Al ser transformado un porcentaje se obtiene un valor (en grados) entre 0 y 90

cada sitio. Puesto que el número de muestras fue relativamente reducido, se estimó el porcentaje de positivos reuniendo los resultados de las muestras de aves silvestres y las domésticas. Los porcentajes de incidencia se normalizaron mediante la transformación de arcoseno (\sin^{-1}).

Con el fin de verificar la posible existencia de una relación inversa entre el porcentaje de aves migratorias y la incidencia de anticuerpos contra VON en aves residentes, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para datos normalizados.

La validación preliminar del ensayo de ELISA de bloqueo se realizó mediante una prueba de X^2 con un nivel de confianza del 95%. Se calculó la especificidad y sensibilidad del ELISA de bloqueo respecto a la prueba estándar de oro, PRNT.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Determinación de la proporción de aves migratorias versus residentes en los diferentes sitios y épocas de estudio.

Para este estudio, se eligió tres sitios en el departamento de Izabal que corresponden a áreas en donde se piensa que hay diferentes proporciones de aves migratorias versus residentes. Además, las fechas en que se realizó el trabajo de campo, corresponden a diferentes épocas de migración de las aves que provienen de Norte América (Ver antecedentes y metodología).

Para evaluar la proporción de aves migratorias se utilizó dos metodologías como se explica en la sección VI (Metodología). A continuación se presentan los análisis realizados con cada una de ellas.

1. **Resultados obtenidos por captura en redes de niebla.** Se comparó la proporción de aves migratorias y residentes capturadas en las redes de niebla en diferentes épocas de migración de las aves como se muestra en el cuadro 2. De 68 individuos capturados en las redes, se identificó 44 especies diferentes pertenecientes a 15 familias y 7 órdenes (Ver anexo B: “Listado de aves identificadas durante el trabajo de campo.”).

Mes	Sitio	#Aves migratorias capturadas en red	#Aves residentes capturadas en red	% transformado de aves migratorias capturadas en red
enero	Machacas	24	17	49.80
	P. Barrios	10	44	25.90
	Manabique	27	10	58.29
abril	Machacas	15	31	35.05
	P. Barrios	14	28	35.50
	Manabique	31	13	56.80
junio	Machacas	0	30	5.17
	P. Barrios	0	25	5.65
	Manabique	0	23	5.89
agosto	Machacas	2	1	52.50
	P. Barrios	1	2	37.50
	Manabique	35	4	70.43

Cuadro 2. Porcentaje normalizado de aves migratorias por sitio y época de estudio según el método de redes.

Como se observa en el cuadro 2, los resultados en las redes correspondieron bastante bien a lo esperado en los meses de enero, abril y agosto. Lo esperado era tener un mayor porcentaje de aves migratorias en Punta de Manabique. Respecto a Manabique, Machas presentó un menor porcentaje de migratorias. Puerto Barrios es el sitio con el menor porcentaje de aves migratorias registrado. En cuanto al mes de junio los resultados también se ajustaron a lo esperado dado que este mes corresponde a la época en que no se espera tener aves migratorias en el país.

Debido a que el diseño experimental de este estudio pretendía hacer una evaluación preliminar y no un muestreo representativo fue necesario aplicar la fórmula de transformación de Arcoseno para tener porcentajes que pudieran ser analizados por pruebas estadísticas y que correspondieran, en la medida de lo posible a un modelo biológico. Las pruebas de hipótesis que se seleccionaron para este estudio se basan en el supuesto de que los datos provienen de una población con distribución normal. Según la teoría estadística, los datos de proporciones provienen de distribuciones binomiales, por lo tanto deben ser transformados antes de poder aplicar las pruebas paramétricas convencionales. La transformación de Arcoseno cumple este propósito. Se usa para transformar una distribución binomial (como la de proporciones) a una normal. Luego de esta transformación se realizó un ANOVA (Análisis de varianza) de dos factores sin repetición. Con esta prueba, se evaluó si la proporción de aves migratorias estaba relacionada con las variables “sitio” y “época” de estudio (Ver Cuadro 1, sección VI; cuadro 2 esta sección). A continuación se presenta, en el cuadro 3, los resultados de este ANOVA.

Factor	gl (grados de libertad)	SS (suma de cuadrados)	MS (cuadrados medios)	F	<i>p</i> ($F > F_{crit}$)
Sitio	2	947.01	437.90	6.06	0.0362
Época	3	4040.20	1346.70	17.22	0.0023
Residuo (error)	6	469.00	78.20		
TOTAL	11	5456.21	1862.80		

Cuadro 3. Análisis de ANOVA con los datos obtenidos por conteo en las redes.

Las hipótesis nulas (H_{o1} y H_{o2}) propuestas para este análisis fueron las siguientes:

H_{o1} = El porcentaje de migratorias es igual para los tres sitios.

H_{o2} = El porcentaje de migratorias es igual para las cuatro épocas.

Las hipótesis alternativas (H_{a1} y H_{a2}) fueron entonces:

H_{a1} = El porcentaje de aves migratorias es distinto en al menos un sitio.

H_{a2} = El porcentaje de aves migratorias es distinto en al menos una época.

Las conclusiones luego de los análisis fueron las siguientes:

1. Por sitio:

$p < 0.05$, por tanto se puede rechazar H_o con un 95% de confiabilidad y se acepta H_a

2. Por época:

$p < 0.01$, por tanto se rechaza H_o con un 99% de confiabilidad y se acepta H_a

Con el fin de ilustrar los resultados de las redes se elaboró una gráfica en la que se resume los resultados obtenidos por sitio a lo largo de todo el estudio. Ver Figura 15.

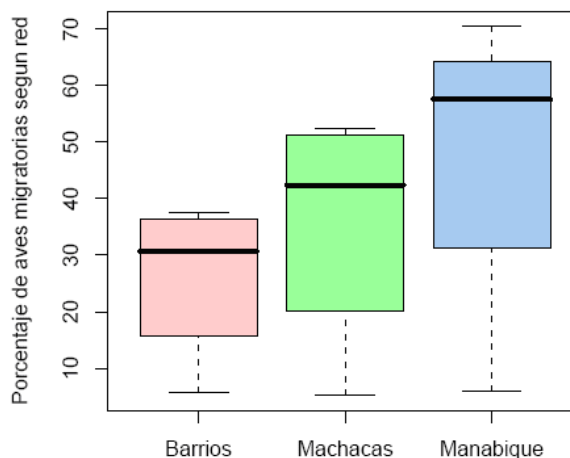


Fig 15. Variación del porcentaje de aves migratorias por sitio según método captura con redes.

Al inicio de este trabajo no se tenía certeza de observar diferencias significativas entre los sitios de estudio puesto que esta hipótesis se basaba únicamente en observaciones ornitológicas previas. Como se puede observar en la figura 16, existe evidencia de que las proporciones de aves migratorias sí se ajustan a nuestro

planteamiento: mayor porcentaje en Manabique respecto a Machacas y en éste mayor porcentaje que en Puerto Barrios. En cuanto a la variable “época de estudio”, las diferencias sí eran esperadas puesto que correspondían a distintas épocas de migración de las aves.

A pesar que los resultados apoyan nuestras hipótesis, consideramos que no se puede asumir con certeza que éstos reflejen una realidad ecológica dado el posible sesgo en esta metodología. En efecto, en las redes se captura únicamente aves de talla relativamente pequeña y con un rango de vuelo cercano al suelo. Por otra parte, la colocación de redes dependió mucho de factores externos como accesibilidad, seguridad, conservación del hábitat, etc. Finalmente, un factor no menos importante, podría ser el hecho que las aves residentes puedan poseer un mejor conocimiento de su entorno. Esto les permitiría percatarse de la presencia de las redes y evitar su paso por las mismas. Este posible sesgo puede explicar la importante dispersión de los datos que se observa en la figura 15, en donde vemos una importante dispersión respecto a la mediana y valores extremos que pueden ser bastante elevados (ver caso de Manabique). En cada sitio se trabajó dos días consecutivos durante cada viaje de campo. Una posible forma de reducir la importante dispersión de los datos sería aumentar el número de repeticiones. Probablemente, esto no eliminaría en su totalidad la influencia de los factores antes mencionados, pero sí permitiría incrementar el número de muestras y tener datos más significativos de la población de aves de cada lugar.

Con el fin de evaluar por otro tipo de metodología, probablemente más representativa, el porcentaje de aves migratorias por sitio y época de estudio, los ornitólogos realizaron censos de aves en cada viaje de campo.

2. Resultados obtenidos por censos de aves. Se comparó la proporción de aves migratorias y residentes registradas durante los censos realizados en cada sitio, en diferentes épocas de migración de las aves como se muestra en el cuadro 4. En el Apéndice B: “Listado de aves identificadas en Izabal.”, se presenta un listado de todas las aves identificadas con certeza por los ornitólogos durante los censos. De 2438 individuos registrados se logró identificar 97 especies diferentes pertenecientes a 34 familias y 15 órdenes.

Mes	Sitio	#Aves migratorias registradas en censo	#Aves residentes registradas en censo	% transformado de aves migratorias registradas en censo
enero	Machacas	2	48	12.73
	P. Barrios	0	55	3.84
	Manabique	6	41	21.60
abril	Machacas	36	50	40.40
	P. Barrios	21	59	31.01
	Manabique	10	23	33.75
junio	Machacas	4	43	17.80
	P. Barrios	2	51	12.36
	Manabique	16	28	37.26
agosto	Machacas	24	53	34.08
	P. Barrios	14	51	27.95
	Manabique	18	44	32.81

Cuadro 4. Porcentaje normalizado de aves migratorias por sitio y época de estudio según el método de censos.

Como se observa en el cuadro 4, los resultados de los censos correspondieron a lo esperado en los meses de enero y junio. Es decir se observó un mayor porcentaje de aves migratorias en Punta de Manabique; un porcentaje intermedio en Machacas del Mar y el menor porcentaje en Puerto Barrios. En los meses de abril y agosto en cambio se invirtió la relación entre Punta de Manabique y Machacas, siendo éste último el que presentó el mayor porcentaje de aves migratorias. Como en el caso de las redes, los datos de censos debieron normalizarse para poder realizar el análisis de ANOVA de de dos factores sin repetición. A continuación se presenta en el cuadro 5 los resultados obtenidos.

Factor	gl (grados de libertad)	SS (suma de cuadrados)	MS (cuadrados medios)	F	p ($F > F_{crit}$)
Sitio	2	319.27	159.69	3.86	0.083
Época	3	903.18	301.06	77.28	0.020
Residuo (error)	6	248.11	41.35		
TOTAL	11	1470.56	502.1		

Cuadro 5. Análisis de ANOVA con los datos obtenidos por conteo en los censos.

Las hipótesis nulas (H_{01} y H_{02}) así como las hipótesis alternativas (H_{a1} y H_{a2}), propuestas para este análisis fueron las mismas que las descritas en el inciso número 1 de la presente sección:

Las conclusiones luego de este análisis fueron las siguientes:

1. Por sitio:

p no es < 0.05 . Sin embargo se puede rechazar H_0 con un 92% de confiabilidad y se acepta H_a .

2. Por época:

$p < 0.05$, por tanto se rechaza H_0 con un 95% de confiabilidad y se acepta H_a .

En condiciones experimentales altamente controladas o para procesos bien definidos se utiliza generalmente un nivel de confianza del 95% para rechazar una hipótesis nula. Sin embargo, en las áreas biológicas rara vez se cumplen estas condiciones. Por la tanto el investigador puede tomar la decisión de aceptar un nivel de confianza más bajo como suele hacerse en modelos ecológicos en donde se utiliza un nivel de confianza de hasta 80% (Zar, 1998; Fernández y Díaz, 2001). En este caso tomamos un nivel de confianza del 92% como válido para aceptar la hipótesis H_{a1} .

Con el fin de ilustrar los resultados de los censos se elaboró una gráfica en la que se resumen los resultados obtenidos por sitio a lo largo de todo el estudio. Ver Figura 16.

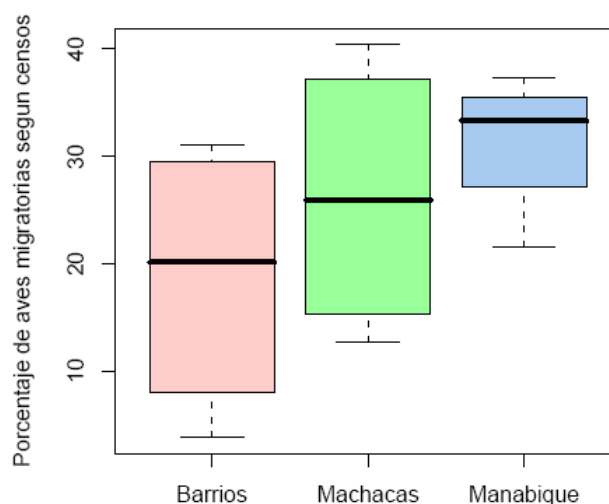


Fig 16. Variación del porcentaje de aves migratorias por sitio según método de censo.

Al analizar las líneas medianas (representadas por la barra negra en la figura 18), se observó una tendencia a registrar un mayor porcentaje de aves migratorias en Punta de Manabique, un porcentaje intermedio en Machacas y uno menor en Puerto Barrios. Sin embargo, podemos notar grandes variaciones en los extremos de las gráficas

correspondientes a los diferentes sitios. De hecho, en dos de los meses estudiados no se guardó la relación esperada puesto que Machacas presentó un mayor porcentaje de aves migratorias. Este fenómeno se observó en los meses de abril y agosto.

Los datos obtenidos por censos y por redes no se pueden comparar por tratarse de dos metodologías totalmente diferentes. Sin embargo, pensamos que los censos podrían reflejar mejor la proporción de aves migratorias a residentes en cada uno de los sitios. Esto se debe a que los transectos abarcan un terreno mucho más extenso dentro del sitio de estudio. Además, en los censos se registró tanto a las aves observadas como a las aves escuchadas (que pueden no movilizarse aunque estén presentes). Finalmente, otro factor importante es el hecho que los censos fueron realizados por dos ornitólogos al mismo tiempo. Esto implica que la contabilización de las aves por transecto se basó en un doble registro.

Al igual que la metodología de redes, este tipo de conteo tiene varios posibles sesgos. Uno de ellos es que, a pesar de haber realizado los transectos en micro-hábitats diferentes, estos se eligieron por conveniencia y no al azar. Por otra parte, cada transecto se recorrió únicamente durante un día por visita. En el caso de que las condiciones climáticas cambiaran (lo cual sucedió) de un día a otro, el comportamiento de las aves se vería afectado. Esto podría haber generado variaciones en el conteo. El problema radica en que la influencia del factor climático, no pudo ser cuantificado, por tratarse de mediciones únicas para cada transecto, por época. En estas condiciones, no sabemos cual es el grado real de sensibilidad de la metodología de censos para percibir la proporción de aves migratorias en cada área. Una manera de incrementar la sensibilidad sería tener repeticiones de los conteos en cada transecto lo cual requeriría del trabajo de varios ornitólogos o más días trabajo. No podemos descartar que las variaciones observadas en los meses de abril y agosto sean anecdóticas, por lo que es importante continuar este tipo de estudio a lo largo de varias estaciones y durante varios años para validar las observaciones obtenidas.

Por último, y de manera general, para aumentar el poder de las pruebas estadísticas como el ANOVA se requiere datos repetidos de un experimento. El propósito principal de este estudio no era conocer un modelo exacto de las condiciones ecológicas de la región, sino hacer una evaluación preliminar de la situación actual en Guatemala. El

ANOVA de dos factores sin repetición no es útil para encontrar diferencias altamente significativas entre las variables experimentales, pero puede usarse para identificar posibles relaciones que serán útiles en el diseño de experimentos futuros.

B. Determinación de la seropositividad para anticuerpos contra VON en muestras de aves residentes (silvestres y domésticas).

Para hallar evidencia de la circulación de VON en la región de Izabal, se procesó un total de 712 muestras de aves silvestres y domésticas, correspondientes a 37 especies diferentes. Todas estas muestras fueron analizadas por medio del ensayo de ELISA de bloqueo. Un total de 63 muestras positivas y negativas, incluyendo muestras de éste y otros estudios, fueron enviadas al Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Fort Collins, Colorado, U.S.A. para su confirmación por la prueba de PRNT. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

1. **Resultados del ELISA de bloqueo.** En el cuadro 6 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en cada sitio y época de muestreo. Para generar esta tabla se tomó en cuenta todas las aves residentes muestreadas, tanto silvestres como domésticas.

Mes	Sitio	Total de residentes muestreados	Muestras positivas	% transformado de aves residentes positivas
enero	Machacas	40	6	23.45
	Barrios	59	16	31.63
	Manabique	27	0	5.45
abril	Machacas	51	6	20.69
	Barrios	41	11	31.55
	Manabique	22	1	14.59
junio	Machacas	57	3	14.19
	Barrios	53	6	20.29
	Manabique	40	0	4.49
agosto	Machacas	35	2	15.21
	Barrios	50	12	29.67
	Manabique	63	0	3.59

Cuadro 6. Porcentaje de aves residentes positivas contra VON según el método de ELISA de bloqueo con el anticuerpo monoclonal 3.1112G.

Como se observa en el cuadro anterior, durante todas las épocas de trabajo se mantuvo una seropositividad más importante en Puerto Barrios (28.28%), seguida de Machas del Mar (18.38%) y por último de Punta de Manabique (7.03%). Con estos resultados se generó mapas que ilustran la seropositividad obtenida para cada uno de los sitios en el departamento de Izabal (Ver Apéndice C, “Mapas de seropositividad en Izabal.”).

Al hacer un análisis por especie y por sitio, pudimos observar que con la excepción de Punta de Manabique, en los otros sitios las gallinas (*Gallus gallus*) fueron el grupo con el mayor porcentaje de seropositividad. Esto podría deberse a que también es el grupo con mayor cantidad de muestras. Sin embargo, en Punta de Manabique no se reportó ninguna gallina positiva. La única ave positiva en este sitio fue una paloma silvestre (*Leptotila cassini*). Ver Apéndice D: “Aves residentes positivas por ELISA de bloqueo.”, con detalle de los resultados por mes, sitio y especie.

Cabe mencionar que para las muestras positivas por ELISA de bloqueo, se hizo al menos tres repeticiones para disminuir el riesgo de reportar falsos positivos. El ELISA de bloqueo fue realizado con el anticuerpo monoclonal 3.1112G que permite distinguir el VON del Virus de Encefalitis de San Louis (SLE por sus siglas en inglés). El SLE pertenece al mismo serogrupo y comparte características ecológicas con el VON. Por ser SLE el virus más cercano al VON en Norte América, es admitido que el ELISA de bloqueo es una de las mejores técnicas para detectar anticuerpos específicos de VON. En nuestro país, el único flavivirus cercano a VON reportado con anterioridad es precisamente SLE, aislado a partir de zancudos infectados al final de los años ‘70 (Cupp *et al.*, 1986). Sin embargo, dado que en Guatemala, hay poco conocimiento de los flavivirus que circulan, no podemos excluir la posibilidad que otro flavivirus cercano (no necesariamente conocido) pueda generar resultados positivos con el monoclonal 3.1112G. Por esta razón, fue necesario verificar los resultados por la prueba considerada como el estándar de oro, la prueba de Reducción de Placas por Neutralización (PRNT por sus siglas en inglés).

2. Validación de la prueba de ELISA de bloqueo por la prueba estándar de oro PRNT. Las 63 muestras enviadas al CDC de Fort Collins fueron procesadas por la

técnica de PRNT analizando los sueros tanto para VON como para SLE como se describe en la sección VI, Metodología. Todos los sueros positivos con PRNT fueron específicos de VON puesto que presentaron al menos 4 diluciones de diferencia con respecto al virus SLE. En el cuadro 7, a continuación, se muestra un resumen de los resultados de esta prueba.

Ensayo	Tipo de ave	Resultado		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA de bloqueo con monoclonal 3.1112G	doméstica	39	12	63
	silvestre	4	8	
PRNT ₉₀ para VON	doméstica	35	16	63
	silvestre	4	8	

Cuadro 7. Comparación de los resultados obtenidos por ELISA de bloqueo y PRNT, con muestras de los Departamentos de Escuintla, Santa Rosa, Izabal, Chiquimula y Petén.

Con estos resultados se procedió a realizar la prueba de Chi cuadrado que permitió validar el ensayo de ELISA de bloqueo respecto al estándar (PRNT). Los resultados obtenidos se describen en el cuadro 8 presentado a continuación.

Ensayo	Resultado	Total
PRNT	positivo	39
	negativo	24
ELISA	positivo	43
	negativo	20
Prueba de X^2 nivel de confianza al 95%		
	anticuerpos VON	No anticuerpos VON
Prueba Positiva	39	4
Prueba Negativa	0	24
Resultados		
	%	
Sensibilidad	100.00	
Especificidad	85.71	

Cuadro 8. Análisis de X^2 comparando los resultados de ELISA de bloqueo y PRNT.




Como se observa en el cuadro 8, la prueba de ELISA de bloqueo tuvo un 100% de sensibilidad para las aves. Esto implica que fue capaz de detectar todas las muestras positivas a VON. La especificidad del ensayo fue de 85.71 % lo cual indica que con esta

técnica no se logró distinguir la totalidad de muestras negativas. En otras palabras, en nuestras manos, el ELISA de bloqueo generó aproximadamente un 15% de falsos positivos. Estos falsos positivos corresponden a cuatro muestras de gallinas cuyo índice de inhibición en el ELISA osciló entre 30-35%. Este es un rango muy cercano al punto de corte del ensayo que es 30%. Según comunicación personal del Dr. Brad Blitvich, es posible que el valor de lectura de los blancos en la prueba, genere estos falsos positivos por lo que en el futuro se recomienda ajustar la técnica a las condiciones del laboratorio de arbovirología de la UVG.

Por medio del PRNT se pudo confirmar la presencia de anticuerpos positivos contra VON en 3 aves residentes, silvestres de Izabal. Estos resultados se muestran en el cuadro número 9. Como se puede constatar en dicho cuadro, en los tres sitios de estudio (Manabique, Machacas y Puerto Barrios) se pudo confirmar la presencia de VON por las técnicas serológicas. De las especies confirmadas como positivas, destacan el *Turdus grayi* de Machacas del Mar y el *Quiscalus mexicanus* de Puerto Barrios. El *T. grayi* es la especie que más se capturó en este sitio, lo cual permite pensar que podría ser un buen blanco para monitorear la actividad del VON (ver Apéndice E: “Especies de aves muestreadas en cada sitio de trabajo.”). Por otra parte, aves de este mismo género así como del género *Quiscalus*, han sido descritas previamente como posibles amplificadores del VON (Komar *et al.*, 2003). De hecho en otros países de la región caribe se ha descrito recientemente seropositividad en aves del género *Turdus*, como lo es *T. plumbeus* en Guantánamo, Cuba (Dupuis *et al.*, 2005).

A pesar del pequeño porcentaje de falsos positivos, el ELISA de bloqueo muestra ser una muy buena técnica para diagnosticar presencia de anticuerpos (Ig G e Ig M) contra VON en las aves. Basándonos en estos datos, consideramos que los resultados del ELISA son lo suficientemente válidos para indicar presencia de VON en las aves muestreadas. A partir del conjunto de resultados obtenidos podemos concluir que es muy probable que el Virus del Oste del Nilo esté circulando en Guatemala. Sin embargo, mientras no se logre un aislado viral no se puede decir con certeza del 100% que es el VON el virus detectado. Pese a lo antes expuesto, los resultados obtenidos constituyen una línea de base preliminar, que puede ser empleada por las autoridades de salud humana y animal

(Ministerio de Salud, Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación) con el fin de que éstas tomen las medidas que consideren pertinentes.

Título	Interpretación	Especie	Sitio de captura	Fotografía
80	WNV	<i>Leptotila cassini</i>	Punta de Manabique	 <p>(Komar,1995)</p>
80	WNV	<i>Turdus grayi</i>	Machacas del Mar	 <p>(Komar, 1995)</p>
80	WNV	<i>Quiscalus mexicanus</i>	Puerto Barrios	 <p>(Gimisó,2003)</p>

Cuadro 9. Títulos de PRNT a 90% para VON, en las muestras de aves silvestres confirmadas como positivas para anticuerpos contra VON

La hipótesis generalmente aceptada para la introducción de VON a una nueva región involucra a las aves migratorias como posibles vehículos. Con el fin de tener datos

preliminares sobre el comportamiento ecológico que pudiera presentar el VON en el país, se buscó la posible relación entre la seropositividad de las aves residentes y la presencia de las aves migratorias en la región.

C. Correlación entre la seropositividad de VON y la proporción de aves migratorias.

Una de nuestras hipótesis de trabajo plantea la existencia de una relación inversa entre la seropositividad de VON y la proporción de aves migratorias en cada sitio y época de estudio.

El fundamento de esta idea es que, si bien el VON podría ser “vehiculado” por las aves migratorias, al llegar a un nuevo sitio necesita establecerse en las aves residentes presentes. Para que esto suceda deben coincidir en esos “nuevos sitios” al menos tres factores: 1) que existan vectores competentes; 2) que existan hospederos amplificadores y 3) que exista la probabilidad de que el vector infectado coincida con el ave residente. De esta forma, si en una población existe un número muy elevado de aves migratorias respecto a las residentes deberíamos tener menos oportunidades de que el virus, potencialmente traído por esas aves, se establezca en la población residente. Esto se debe a una simple cuestión de probabilidad. En efecto, si por 99 aves migratorias existe una sola ave residente la probabilidad de que ésta sea infectada es del 1%. En el caso de los sitios en donde haya aves migratorias, pero que predominen las residentes, debería observarse una tendencia inversa. Este planteamiento es válido únicamente si en cada sitio se cumplieran las dos primeras premisas mencionadas anteriormente (tener vectores y hospederos competentes por igual).

A partir de los resultados obtenidos por las dos metodologías de conteo y el ELISA de bloqueo se realizó un análisis de correlación de Pearson. Con este análisis se pudo evaluar si la tendencia de los resultados concuerda con nuestra hipótesis. El resultado de este análisis es presentado en el cuadro 10.

En las siguientes páginas se presentan también las gráficas de correlación que se obtuvo al tabular los resultados (figura 17 y figura 18).

Nivel de confianza propuesto para modelos biológicos: 80%.	
H₀ : no existe relación entre la seropositividad para anticuerpos contra VON en aves residentes y el porcentaje de aves migratorias.	
Censo	$r = -0.7830 < \underline{-0.3797} < 0.2482$ $p = 0.2233$
Conclusión	Se acepta la H ₀ .
Redes	$r = -0.6931 < \underline{-0.1980} < 0.4240$ $p = 0.5372$
Conclusión	Se acepta la H ₀ .

Cuadro 10. Análisis de correlación de Pearson para datos normalizados de seropositividad y porcentaje de aves migratorias, para ambas metodologías de conteo de aves.

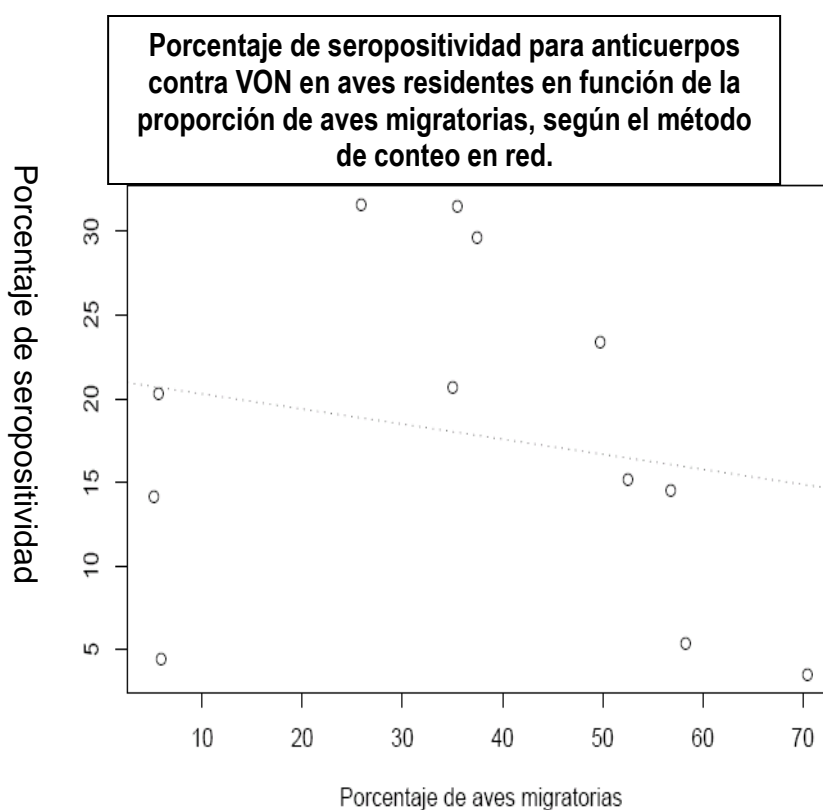


Fig 17. Relación entre la seropositividad para anticuerpos contra VON en aves residentes y el porcentaje de aves migratorias según capturas en red.

En el cuadro 10 y figura 17, se puede observar que con los datos de redes no se obtuvo evidencia que soporte la existencia de una relación inversa entre la seropositividad de anticuerpos contra VON en aves residentes y el porcentaje de aves migratorias en todos los sitios de estudio.

En el caso de los censos (Figura 18, a continuación), sí se percibe una ligera tendencia negativa entre la seropositividad de anticuerpos contra VON en aves residentes y el porcentaje de aves migratorias.

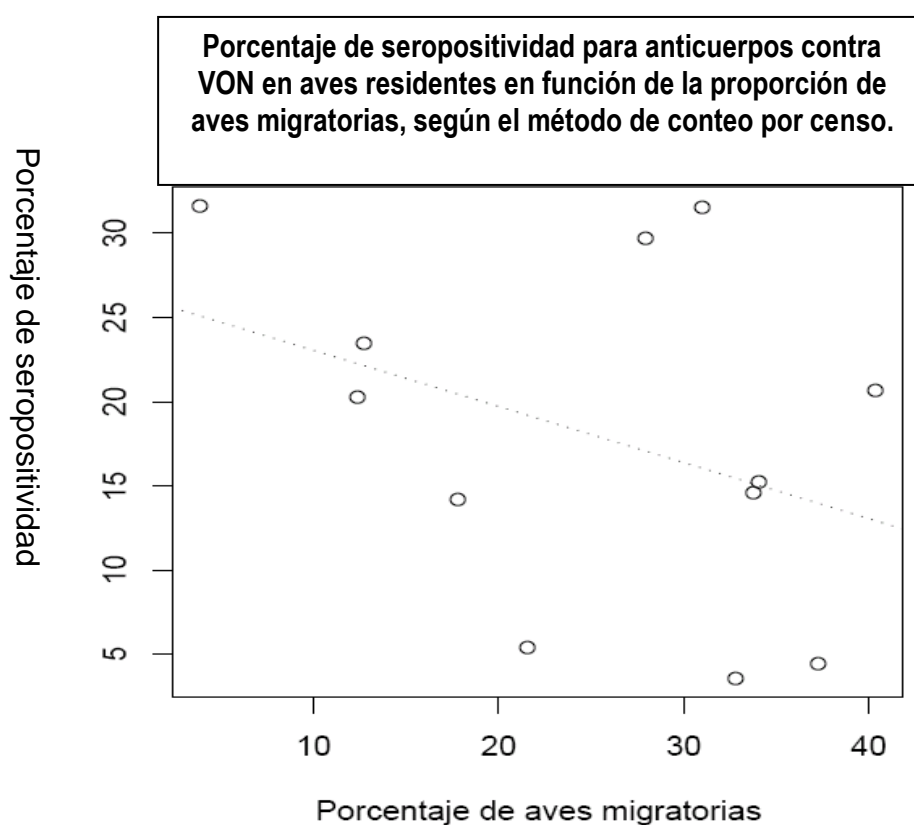


Fig 18. Relación entre la seropositividad para anticuerpos contra VON en aves residentes y el porcentaje de aves migratorias según censos.

Según el análisis de correlación (cuadro 10), estos datos no son significativos por tener un nivel de confianza de 78%. Este valor es inferior al límite que se decidió aceptar para modelos biológicos. Aunque estadísticamente no existe correlación, consideramos que sí se nota una tendencia a que aumente la seropositividad de anticuerpos contra VON

cuando disminuye la proporción de aves migratorias. Como ya se expuso, las metodologías utilizadas en este estudio presentan ciertas limitaciones experimentales que podrían influir en el resultado del análisis de correlación. Una de estas es el número reducido de muestras colectado de aves residentes. Como posible solución para mantener aproximadamente constante y en cantidad suficiente el número de muestras, se puede proponer el uso de poblaciones centinelas como por ejemplo gallinas, en cada sitio. Otro factor que debe considerarse es que para tener un tamaño de muestra significativo al analizar la seropositividad en cada sitio, se sumó el total de individuos positivos domésticos y silvestres. Al hacer esto no se tomó en cuenta el hecho que para cada sitio se tiene diferencias en las especies capturadas, en general no se tiene ni la misma cantidad, ni el mismo tipo de especies por sitio (ver Apéndice E: “Especies de aves muestreadas en cada sitio de trabajo.”). Aunque se desconoce si las especies muestreadas difieren de manera significativa en la susceptibilidad a una infección por VON, si existiera diferencias, éstas podrían generar un importante sesgo en la interpretación de los resultados.

Finalmente, sería recomendable recabar información sobre los posibles artrópodos vectores que circulan en los sitios estudiados para luego analizar si estos pueden ser competentes para la transmisión del VON.

Debemos recordar las premisas planteadas para el establecimiento de un virus en un sitio “nuevo” si queremos comparar y relacionar las diferencias en porcentajes de aves migratorias y la incidencia del VON (asumiendo que los anticuerpos detectados reflejen actividad viral, y que la misma corresponda a las fechas en que se trabajó). Esto implica la coexistencia del VON con vectores y hospederos competentes en cada uno de los sitios. En ningún momento, el presente estudio puede emplearse de forma contundente para indicar la presencia del VON en la población de aves residentes. Se requiere también de estudios que establezcan cuáles de las especies de aves silvestres, o domésticas podrían actuar como hospederos amplificadores. Lo único que podemos decir con nuestros resultados es que la detección de anticuerpos contra VON refleja la posible presencia del virus en Izabal, en un momento dado, en la población de aves residentes muestreadas. Únicamente cuando podamos demostrar que se ha establecido un ciclo enzoótico en el país por medio de: la persistencia de aves seropositivas detectadas; la seroconversión de

individuos que hayan sido previamente negativos y se vuelvan positivos; y/o el aislamiento viral (a partir de zancudos o aves muertas), podremos concluir que el VON se estableció en nuestro territorio.

Lo anteriormente expuesto indica la necesidad de continuar el esfuerzo de investigación en el Departamento de Izabal. Esto debido a que la evidencia experimental con la que se cuenta a la fecha nos indica que es un buen candidato a ser un posible foco de transmisión viral. Si en el futuro se continúa con estas investigaciones, podría ser de utilidad tomar en cuenta las experiencias mencionadas en este trabajo. Éstas podrían ayudar en la elaboración de un diseño experimental que, según sean los objetivos planteados, incluya el análisis de otros parámetros que puedan influenciar la ecología del VON (por ejemplo otros posibles hospederos, condiciones climáticas, etc.). Por otra parte, sería recomendable extender este tipo de estudio a otros lugares de Guatemala que presenten condiciones ecológicas similares a las de Izabal, es decir presencia de aves migratorias, de potenciales vectores y de aves residentes.

VIII. CONCLUSIONES

1. Empleando la metodología de redes se determinó que sí existen diferencias significativas en la proporción de aves migratorias registradas por sitio ($p=0.0362$) y época ($p=0.0023$). Punta de Manabique registró la mayor proporción de aves migratorias (47.85%) seguido de Machacas del Mar (35.63%) y, por último, la ciudad de Puerto Barrios (26.14%).
2. Empleando la metodología de censos se determinó que sí existen diferencias significativas en la proporción de aves migratorias registradas por época ($p=0.020$). Por sitio podemos afirmar con un 92% de confianza que las diferencias registradas son significativas. Punta de Manabique registró la mayor proporción de aves migratorias (31.35%) seguido de Machacas del Mar (26.25%) y por último ciudad de Puerto Barrios (18.79%).
3. Se determinó la asociación entre los resultados del ELISA de bloqueo y el estándar de oro, PRNT, con un 95% de confianza ($p=3.43E-12$).
4. Se validó la aplicación del ELISA de bloqueo como prueba de tamizaje para el VON, empleando muestras de suero de aves residentes silvestres y domésticas. El ELISA de bloqueo presentó una sensibilidad de 100% y una especificidad de 85.71% respecto a los resultados obtenidos por la prueba estándar PRNT.
5. Se puso en evidencia la posible circulación del VON aves residentes de Izabal, Guatemala.
6. Por medio del ELISA de bloqueo se determinó que Puerto Barrios fue el sitio con mayor seropositividad de anticuerpos contra VON (28.28%), seguido de Machacas del Mar (18.38%) y finalmente de Punta de Manabique (7.03%).
7. Empleando la proporción de aves migratorias determinada por el método de censos, se aplicó un análisis de correlación de Pearson, que permitió inferir (con 78% de confianza) la posible relación inversa entre la proporción de aves migratorias y la seropositividad en aves residentes silvestres y domésticas en izabal ($r = -0.3797$).

IX. RECOMENDACIONES

1. Para mejorar la precisión en la determinación de la proporción de aves migratorias por sitio y época se necesita incrementar el número de conteos. Esto permitirá reducir errores debidos al azar y a la variabilidad biológica del fenómeno cuantificado. Así mismo se incrementaría el tamaño de la muestra lo cual reduce los errores tipo II; esto permitirá incrementar la potencia estadística para inferir a partir de los resultados, la existencia o no de las diferencias en la proporción de aves migratorias considerando las variables sitio y época.
2. Para determinar la seropositividad en aves residentes de la zona de estudio, se debe incrementar y mantener constante el número de muestras colectadas. El uso de aves centinela, como gallinas, es una alternativa viable. En el caso del monitoreo de la actividad del VON en aves silvestres, existe la posibilidad de enfocarse en individuos de las especies *Turdus grayi* y *Quiscalus mexicanus*. La población registrada de estas aves es numerosa en los sitios de estudio, se halló individuos seropositivos, y se ha reportado que aves de estos géneros pueden ser hospederos amplificadores del VON.
3. Redefinir el punto de corte del ELISA de bloqueo para evitar falsos positivos.
4. Para comprender el ciclo enzootico del VON en regiones tropicales, se debería incluir en estudios futuros, un componente entomológico. Esto permitiría conocer las posibles especies de zancudos que puedan actuar como vectores competentes del VON, y eventualmente obtener un aislado viral para confirmar la presencia del VON en Guatemala.

X. LITERATURA CITADA

- Blitvich, B., I. Fernández-Salas, J. Contreras-Cordero, N. Marlene, J. González-Rojas, N. Komar, D. Gubier, C. Calisher, B. Beaty. 2003. *Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Horses, Coahuila State, Mexico*. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 853-856pp.
- Blitvich, B., N. Marlenee, R. Hall, C. Calisher, R. Bowen, J. Rooehrig, N. Komar, S. Langevin, B. Beaty. 2003. *Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Serum Antibodies to West Nile Virus in Multiple Avian Species*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 1041-1047pp.
- Brinton, M. 2002. *The Molecular Biology of west Nile Virus: A New Invader of the Western Hemisphere*. *Annual Review Microbiology*. 56: 371-402pp.
- Campbell, G., A. Marfin, R. Lanciotti. 2002. *Review: West Nile Virus*. *The Lancet Infectious Diseases*. 2: 519-529pp.
- Cruz, L. V. Cardenas, M. Abarca, T. Rodriguez, R. Flores Reyna, M. Serpas, R. Fontaine, D. Beasley, A. Travassos Da Rosa, S. Weaver, R. Tesh, A. Powers, G. Suarez-Rangelshort. 2005. *Report: Serological Evidence of West Nile Virus Activity in El Salvador*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 72(5): 612-615pp.
- Cupp, E.W., W. Scherer, J. Lok, R. Brenner, G. Dziem, J. Ordonez JV. *Entomological studies at an enzootic Venezuelan equine encephalitis virus focus in Guatemala, 1977-1980*. 1986. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 35(4):851-859pp.
- Dauphin, Gwaëlle, S. Zientara, H. Zeller, B. Murgue. 2004. *West Nile: worldwide current situation in animals and humans*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 27: 343-355pp.

- Dupuis, A., P. Marra, L. Kramer. 2003. *Serologic Evidence of West Nile Virus Transmission, Jamaica, West Indies*. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 860-863pp.
- Dupuis, A., P. Marra, R. Reitsma, M. Jones, K. Louis, L. Kramer. 2005. *Short Report: Serologic evidence for West Nile Virus transmission in Puerto Rico and Cuba*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 73(2): 474-776pp.
- Ebel, G., A. Dupuis, D. Nicholas, D. Young, J. Maffei, L. Kramer. 2002. *Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Antibodies to West Nile virus in Birds*. *Emerging Infectious Diseases* 8: 979-982pp.
- Estrada-Franco, J., R. Navarro-López, D. Beasley, L. Coffey, A. Carrara, A. Travassos da Rosa, T. Clements, E. Wang, G. Ludwig, A. Campomanes Cortes, P. Paz Ramírez, R. Tesh, A. Barret, S. Weaver. 2003. *West Nile Virus in Mexico: Evidence of Widespread Circulation since July 2002*. *Emerging Infectious Diseases* 9: 1604-1607pp.
- Fernández, P., P. Díaz. *Significancia estadística y relevancia clínica*. 2001. *Atención Primaria*. España. 8:191-195p.
- Flint, J., L. Enquist, R.M. Krug, V. Racaniello, A. Skalka. 2000. *Virology. Molecular Biology, Patogénesis and Control*. 1ª Ed. ASM Press. Washington, Estados Unidos. 804p.
- FUNDARY-ONCA (Comps). 2001. *Plan Maestro del Área de Protección Especial Punta de Manabique (versión ejecutiva)*. Consejo Nacional de Áreas Protegidas, Fundación Mario Dary Rivera. Guatemala.
- Howell, S., S. Webb. 2001. *The birds of Mexico and Northern Central America*. 1ª Ed. Oxford University Press. Estados Unidos. 851p.

- Janeway, C., P. Travers, M. Walport, M. Schlomchick. 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5a Ed. Garland Publishing. Estados Unidos. 732p.
- Komar, N., 2005. *West Nile Virus: Epidemiology and Ecology in North America*. *Advances in Virus Research*. 61: 185-234pp.
- Komar, O., M.B. Robbins, K. Klenk, B. Blitvich, N. Marlenee, K. Burkhalter, D. Gubler, G. González, C. Peña, A. Peterson, N. Komar. 2003. *West Nile Virus Transmission in Resident Birds, Dominican Republic*. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 222-226pp.
- Komar, N., S. Langevin, S. Hinten, N. Nemeth, E. Edwards, D. Hettler, B. Davies, R. Bowen, M. Bunning. 2003. *Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus*. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 311-322pp.
- Kuno, G., G. Chang, K. Tsuchiya, N. Karabatsos, C.B. Cropp. 1998. *Phylogeny of the Genus Flavivirus*. *Journal of Virology*. 72: 73-83pp.
- Lanciotti, R. 2003. *Molecular Amplification Assays for the detection of Flaviviruses*. *Advances in Virus Research*. 61: 67-98pp.
- Lennette, E., D. Lennette, E. Lennette. 1995. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections*. 7a Ed. American Public Health Association. Estados Unidos. 189-212pp.
- Lewin, B. 2004. *Genes VIII*. 8a Ed. Prentice Hall. Estados Unidos. 1027p.
- Loroño-Pino, M., B. Blitvich, J. Farfán-Ale, F. Puerto, J. Blanco, N. Marlene, E. Rosado-Paredes, J. García-Rejón, D. Gubler, C. Calisher, B. Beaty. 2003. *Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Horses, Yucatán State, Mexico*. *Emerging Infectious Diseases*. 9:857-859pp.

- Marquardt, W.C., B.C. Kondratieff, C.G. Moore, W. Black IV, A. James, J. Freier, J. Hemingway, H. Hagedorn, S. Higgs. 2005. *Biology of Disease Vectors*, 2^a Ed. Elsevier Academic Press. Estados Unidos. 785p.
- McLean, R.G., S.R. Ubico, D. Bourne, N. Komar. 2002. *West Nile Virus in Livestock and Wildlife*. Current Topics in Microbiology and Immunology. 267: 272-308pp.
- Peterson, A., N. Komar, O. Komar, A. Navarro-Sigüenza, M. Robbins, E. Martínez-Meyer. 2004. *Priority Contribution West Nile Virus in the New World: potential impact on bird species*. Bird Conservation International. 14: 215-232pp.
- Quirín, R., M. Salas, S. Zientara, H. Zeller, J. Labie, S. Murri, T. Lefrancois, D. Martínez. 2004. *West Nile Virus in Guadeloupe*. Emerging Infectious Diseases. 4: 706-708pp.
- Strickenberger, M. 2000. *Evolution*. 3a Ed. Jones and Bartlett Publishers. Estados Unidos. 721p.
- Zar, J. 1998. *Biostatistical Analysis*. 4ta edición. Prentice Hall. Estados Unidos. 929p.
- CDC. 2002. CDC <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/ecology.htm> [Con acceso el 7-10-2004].

XI. APÉNDICE

A. Boleta de datos de campo.

Nombre del medidor		ID		A		Clima			Coordenadas			Sexo		Edad			Tamaño		Tamaño		Tamaño		Comentarios	
						Temperatura	Humedad	Nubosidad	Longitud	Latitud	Altitud	M	H	D	A	S	A	J	pico	cola	ala	Peso (g)		
# Muestra	Especie	M	R	Código	# Bania	# Red	Hora				M	H	D	A	S	A	J	pico	cola	ala	Peso (g)	Comentarios		

B. Listado de aves identificadas durante el trabajo de campo.

#	Especie	Familia	Orden	Machacas		Manabique		Puerto Barrios	
				Censos	Redes	Censos	Redes	Censos	Redes
1	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Phalacrocoracidae	Pelecaniformes			1			
2	<i>Anhinga anhinga leucogaster</i>	Anhingidae	Pelecaniformes			1			
3	<i>Egretta alba egretta</i>	Ardeidae	Ciconiformes	1					
4	<i>Egretta caerulea</i>	Ardeidae	Ciconiformes	1		1			
5	<i>Egretta thula</i>	Ardeidae	Ciconiformes	1					
6	<i>Bubulcus i. Ibis</i>	Ardeidae	Ciconiformes	1					
7	<i>Butorides virescens</i>	Ardeidae	Ciconiformes	1		1	1		
8	<i>Cathartes aura</i>	Cathartidae	Ciconiformes			1			
9	<i>Coragyps atratus</i>	Cathartidae	Ciconiformes	1		1		1	
10	<i>Buteo magnirostris</i>	Accipitridae	Falconiformes	1		1		1	
11	<i>Buteo nitidus</i>	Accipitridae	Falconiformes					1	
12	<i>Herpethotes cachinnans</i>	Falconidae	Falconiformes	1					
13	<i>Falco sparverius</i>	Falconidae	Falconiformes	1					
14	<i>Falco ruficularis</i>	Falconidae	Falconiformes	1				1	
15	<i>Ortalis vetula</i>	Cracidae	Galliformes	1					
16	<i>Aramus guarauna dolosus</i>	Aramidae	Galliformes	1					
17	<i>Aramides axillaris</i>	Rallidae	Galliformes			1			
18	<i>Laterallus exilis</i>	Rallidae	Galliformes	1		1			
19	<i>Porphyryla martinica</i>	Rallidae	Galliformes	1					
20	<i>Jacana s. spinosa</i>	Jacanidae	Charadriiformes	1					
21	<i>Pluvialis squatarola</i>	Charadriidae	Charadriiformes			1			
22	<i>Charadrius semipalmatus</i>	Charadriidae	Charadriiformes	1		1			
23	<i>Charadrius v. vociferus</i>	Charadriidae	Charadriiformes						
24	<i>Actitis macularia</i>	Scolopacidae	Charadriiformes			1	1		
25	<i>Calidris alba</i>	Scolopacidae	Charadriiformes			1			
26	<i>Larus atricilla</i>	Laridae	Charadriiformes			1			
27	<i>Columba flavirostris</i>	Columbidae	Columbiformes	1				1	
28	<i>Columba livia spp</i>	Columbidae	Columbiformes					1	
29	<i>Columbina talpacoti</i>	Columbidae	Columbiformes	1	1	1		1	1
30	<i>Columbina inca</i>	Columbidae	Columbiformes			1	1		
31	<i>Columbina passerina pallescens</i>	Columbidae	Columbiformes			1	1		
32	<i>Aratinga astec</i>	Psittacidae	Psittaciformes	1					
33	<i>Amazona a. autumnalis</i>	Psittacidae	Psittaciformes	1					
34	<i>Piaya cayana</i>	Cuculidae	Cuculiformes	1		1			
35	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	Cuculidae	Cuculiformes	1	1			1	
36	<i>Strix virgata</i>	Strigidae	Strigiformes	1					
37	<i>Glaucidium brasilianum</i>	Strigidae	Strigiformes	1				1	
38	<i>Nyctidromus albicollis</i>	Caprimulgidae	Caprimulgiformes	1					
39	<i>Phaethornis superciliosus</i>	Trochilidae	Apodiformes				1		
40	<i>Pygmornis longuemareus</i>	Trochilidae	Apodiformes	1					

#	Especie	Familia	Orden	Machacas		Manabique		Puerto Barrios	
				Censos	Redes	Censos	Redes	Censos	Redes
41	<i>Amazilia t. tzacatl</i>	Trochilidae	Apodiformes	1		1	1		
42	<i>Amazilia rutila</i>	Trochilidae	Apodiformes		1				1
43	<i>Archilochus colubris</i>	Trochilidae	Apodiformes				1		
44	<i>Hylocharis eliciae</i>	Trochilidae	Apodiformes		1		1		
45	<i>Anthracothorax p. prevostii</i>	Trochilidae	Apodiformes				1		
46	<i>Trogon sp</i>	Trogonidae	Trogoniformes			1			
47	<i>Ceryle t. torquata</i>	Alcedinidae	Coraciiformes			1		1	
48	<i>Chloroceryle amazona mexicana</i>	Alcedinidae	Coraciiformes	1		1			
49	<i>Chloroceryle aenea stictoptera</i>	Alcedinidae	Coraciiformes			1			
50	<i>Momotus momota</i>	Momotidae	Coraciiformes	1					
51	<i>Pteroglossus torquatus</i>	Ramphastidae	Piciformes			1			
52	<i>Centurus aurifrons</i>	Picidae	Piciformes	1	1	1		1	
53	<i>Dryocopus lineatus</i>	Picidae	Piciformes			1			
54	<i>Xiphorhynchus guttatus</i>	Dendrocolaptidae	Passeriformes			1			
55	<i>Camptostoma imberbe</i>	Tyrannidae	Passeriformes				1		
56	<i>Oncostoma cinereigulare</i>	Tyrannidae	Passeriformes						
57	<i>Contopus cooperi</i>	Tyrannidae	Passeriformes	1				1	
58	<i>Contopus cinereus</i>	Tyrannidae	Passeriformes					1	
59	<i>Empidonax sp</i>	Tyrannidae	Passeriformes				1		
60	<i>Myiarchus crinitus</i>	Tyrannidae	Passeriformes	1		1			
61	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Tyrannidae	Passeriformes	1		1		1	
62	<i>Megarhynchus pitangua</i>	Tyrannidae	Passeriformes	1					
63	<i>Myiozetetes similis</i>	Tyrannidae	Passeriformes	1		1		1	
64	<i>Tyrannus melancholicus</i>	Tyrannidae	Passeriformes	1		1		1	
65	<i>Tityra inquisitor fraserii</i>	Tyrannidae	Passeriformes	1					
66	<i>Manacus candei</i>	Pipridae	Passeriformes	1		1	1		
67	<i>Hirundo rustica erythrogaster</i>	Hirundinidae	Passeriformes	1					
68	<i>Hirundo pyrrhonata</i>	Hirundinidae	Passeriformes	1					
69	<i>Campylorhynchus zonatus</i>	Troglodytidae	Passeriformes	1					
70	<i>Thryothorus maculipectus</i>	Troglodytidae	Passeriformes	1		1	1		
71	<i>Troglodytes musculus</i>	Troglodytidae	Passeriformes					1	1
72	<i>Dumetella carolinensis</i>	Mimidae	Passeriformes	1	1	1	1	1	1
73	<i>Catharus mustelinus</i>	Turdidae	Passeriformes		1	1	1		1
74	<i>Catharus ustulatus</i>	Turdidae	Passeriformes		1		1		1
75	<i>Turdus grayi</i>	Turdidae	Passeriformes	1				1	
76	<i>Sporophila aurita corvina</i>	Emberizidae	Passeriformes	1				1	
77	<i>Sporophila torqueola</i>	Emberizidae	Passeriformes	1	1		1	1	1
78	<i>Volatinia jacarina</i>	Emberizidae	Passeriformes						1
79	<i>Pheucticus ludovicianus</i>	Emberizidae	Passeriformes	1				1	
80	<i>Saltator coerulescens</i>	Emberizidae	Passeriformes	1				1	

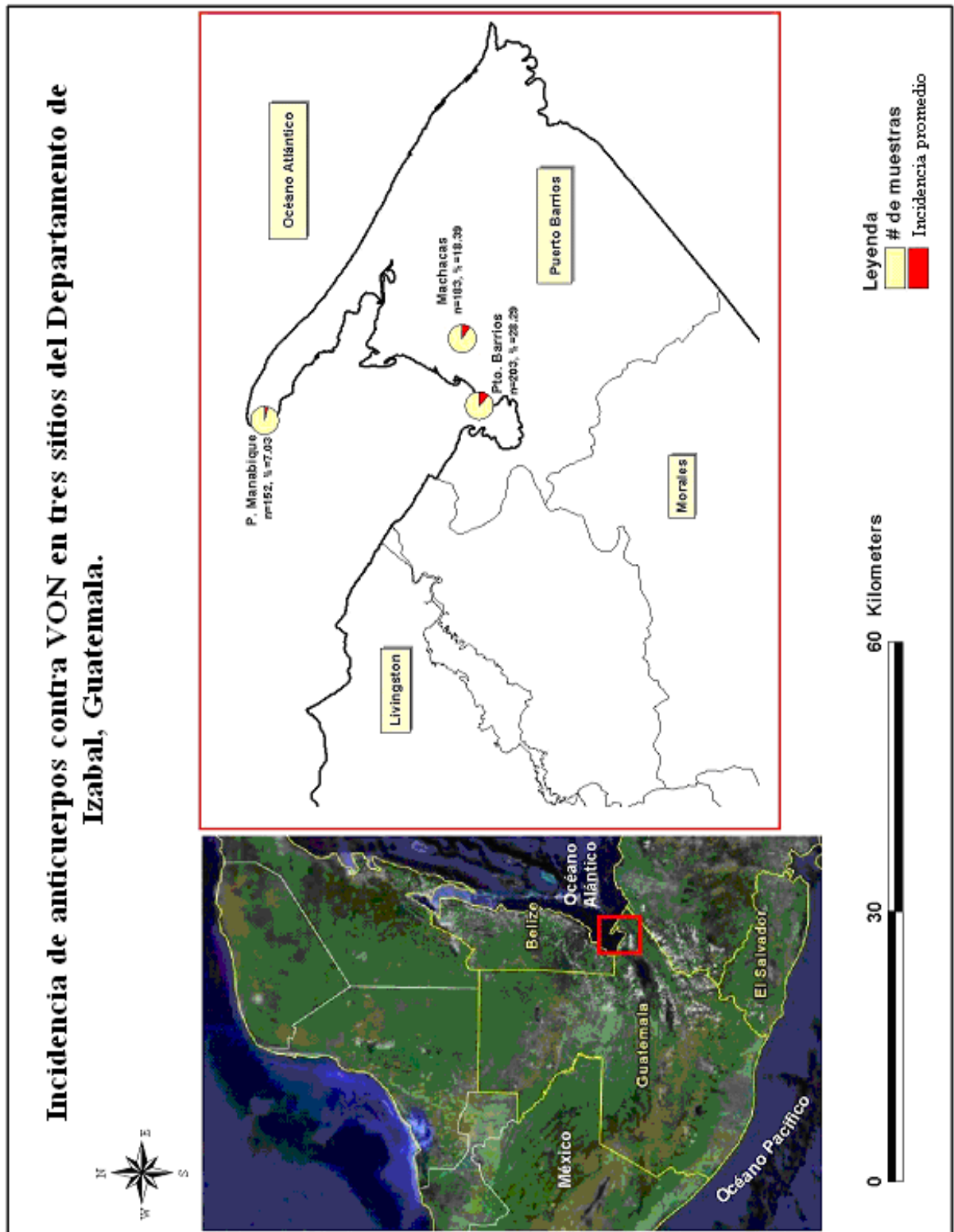
#	Especie	Familia	Orden	Machacas		Manabique		Puerto Barrios	
				Censos	Redes	Censos	Redes	Censos	Redes
81	<i>Passerina cyanea</i>	Emberizidae	Passeriformes		1				
82	<i>Passerina ciris</i>	Emberizidae	Passeriformes		1		1		1
83	<i>Piranga rubra</i>	Emberizidae	Passeriformes	1		1		1	
84	<i>Thraupis episcopus cana</i>	Emberizidae	Passeriformes			1		1	
85	<i>Thraupis abbas</i>	Emberizidae	Passeriformes	1				1	
86	<i>Euphonia affinis</i>	Emberizidae	Passeriformes	1				1	
87	<i>Cyanerpes cyaneus carneipes</i>	Emberizidae	Passeriformes			1			
88	<i>Mniotilta varia</i>	Parulidae	Passeriformes			1	1		
89	<i>Dendroica petechia</i>	Parulidae	Passeriformes	1	1	1	1	1	1
90	<i>Dendroica magnolia</i>	Parulidae	Passeriformes	1	1	1	1	1	
91	<i>Dendroica palmarum</i>	Parulidae	Passeriformes				1		
92	<i>Dendroica dominica</i>	Parulidae	Passeriformes				1		
93	<i>Helmitheros vermivora</i>	Parulidae	Passeriformes				1		
94	<i>Setophaga ruticilla</i>	Parulidae	Passeriformes	1	1	1	1		
95	<i>Seiurus aurocapillus</i>	Parulidae	Passeriformes		1	1	1		1
96	<i>Seiurus noveboracensis</i>	Parulidae	Passeriformes			1	1		1
97	<i>Oporornis formosus</i>	Parulidae	Passeriformes			1	1		
98	<i>Lymnotheros swainsonii</i>	Parulidae	Passeriformes				1		
99	<i>Geothlypis trichas</i>	Parulidae	Passeriformes			1	1		1
100	<i>Wilsonia citrina</i>	Parulidae	Passeriformes	1	1		1		
101	<i>Icteria virens</i>	Parulidae	Passeriformes		1		1		
102	<i>Vireo griseus</i>	Vireonidae	Passeriformes	1	1		1		
103	<i>Vireo olivaceus</i>	Vireonidae	Passeriformes	1				1	1
104	<i>Psarocolius montezuma</i>	Icteridae	Passeriformes	1		1		1	
105	<i>Icterus pectoralis</i>	Icteridae	Passeriformes			1			
106	<i>Icterus gularis</i>	Icteridae	Passeriformes			1		1	
107	<i>Icterus galbula</i>	Icteridae	Passeriformes	1		1		1	1
108	<i>Icterus spurius</i>	Icteridae	Passeriformes				1	1	1
109	<i>Agelaius phoeniceus</i>	Icteridae	Passeriformes	1					
110	<i>Dives dives</i>	Icteridae	Passeriformes	1		1		1	
111	<i>Quiscalus mexicanus</i>	Icteridae	Passeriformes	1		1		1	
112	<i>Molothrus aeneus</i>	Icteridae	Passeriformes	1				1	
113	<i>Scaphidura oryzivora impacifica</i>	Icteridae	Passeriformes	1					
114	<i>Cyanocorax morio</i>	Corvidae	Passeriformes	1		1			
Total				65	18	53	34	37	16

Resumen del total de aves identificadas por medio de las metodologías de censos o redes:

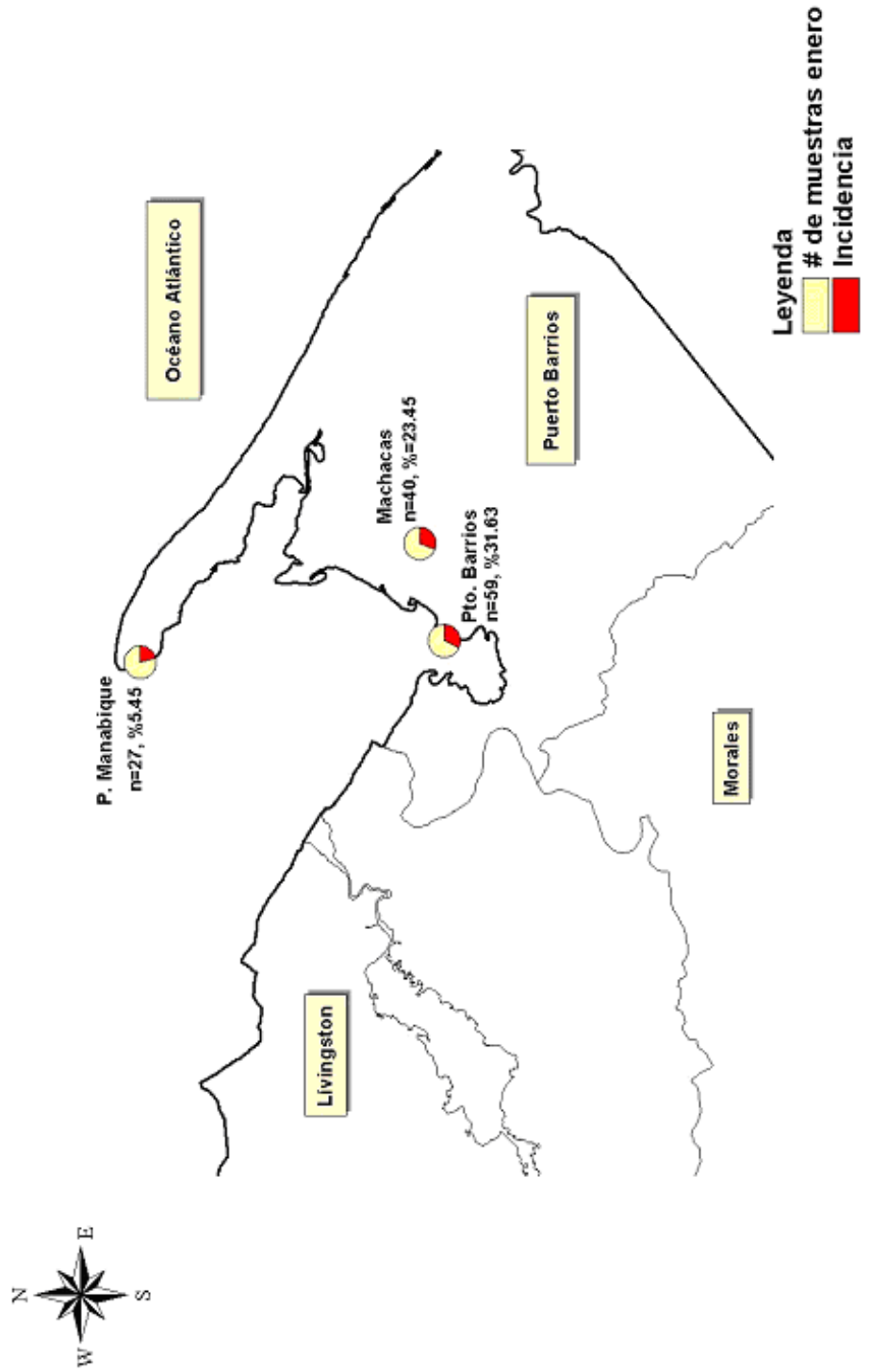
	Especie	Familia	Orden	M	R
Censos	97	34	15	37	60
Redes	44	15	7	27	17
Total	114	36	15	47	67

M= Migratorios y R= Residentes

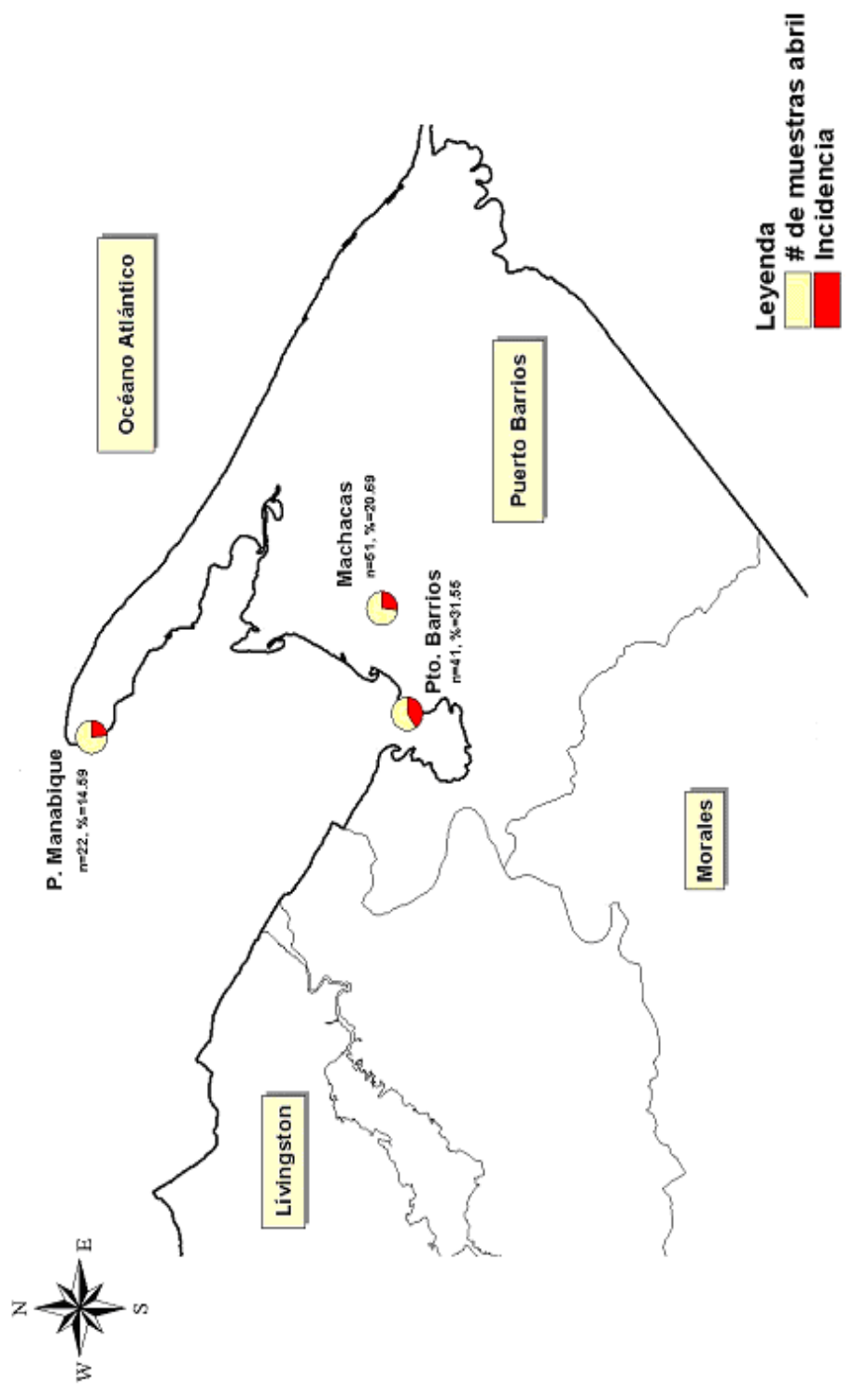
C. Mapas de serpositividad en Izabal. (considerando aves domésticas y silvestres)



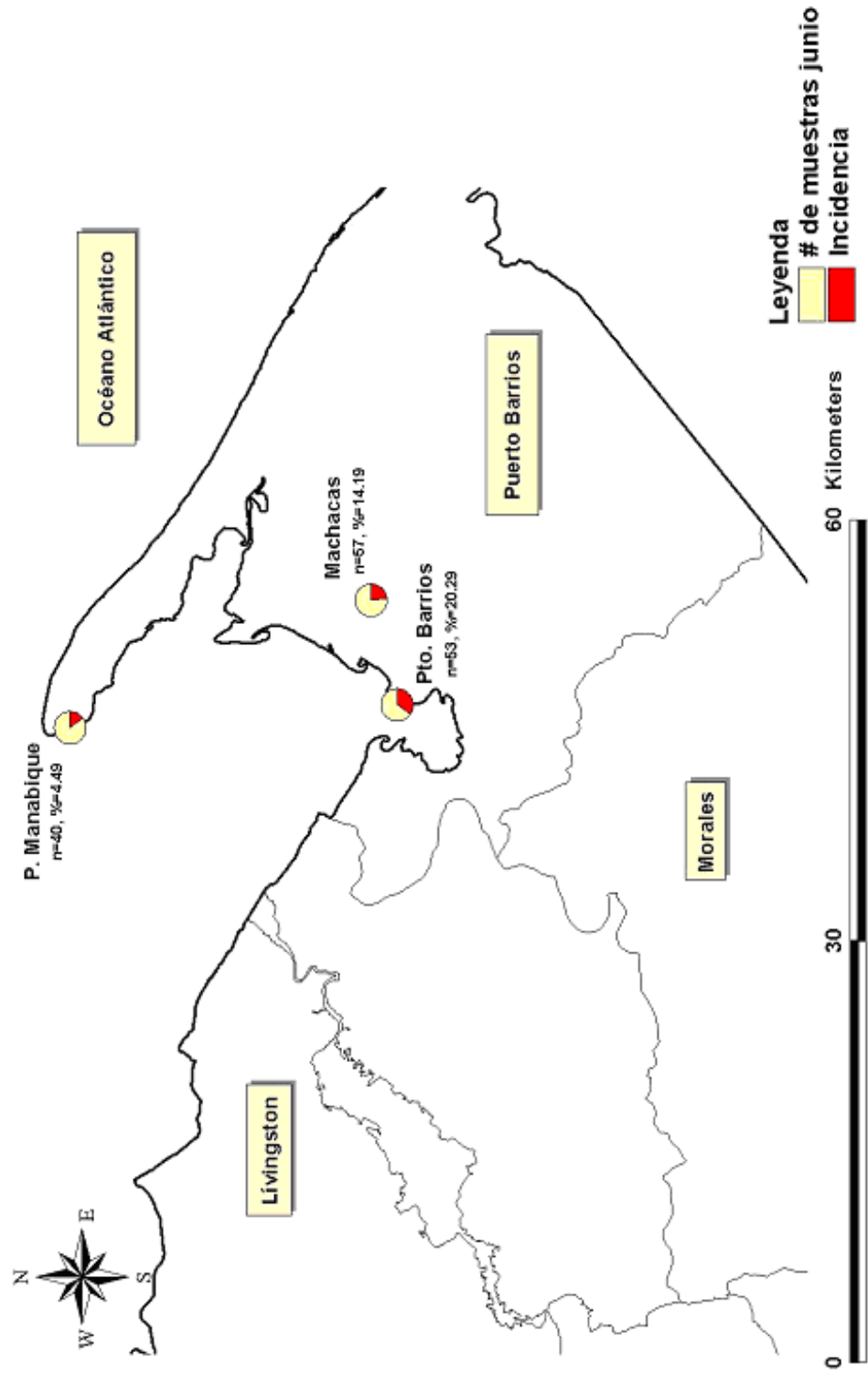
Incidencia de anticuerpos contra VON, en el Departamento de Izabal, Guatemala, durante el mes de enero de 2005.



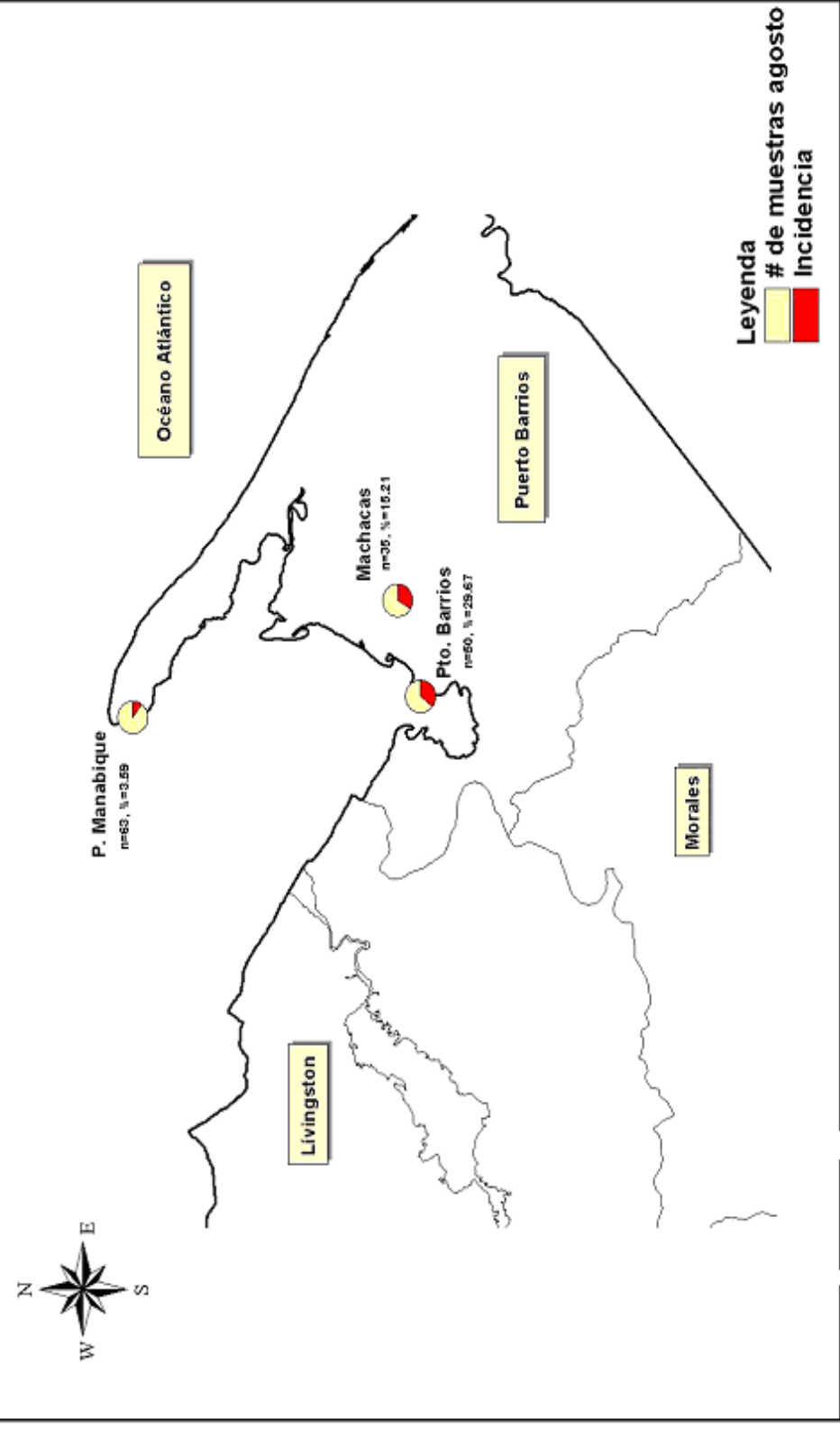
Incidencia de anticuerpos contra VON, en el Departamento de Izabal, Guatemala, durante el mes de abril de 2005.



Incidencia de anticuerpos contra VON, en el Departamento de Izabal, Guatemala, durante el mes de junio de 2005.



Incidencia de anticuerpos contra VON, en el Departamento de Izabal, Guatemala, durante el mes de agosto de 2005.



D. Aves residentes positivas por ELISA de bloqueo.

ENERO	Manabique			Machacas			Barrios		
	pos	N	%	pos	N	%	pos	N	%
<i>Chloroceryle americana septentrionalis</i>				0	1	0.00			
<i>Colaptes aurifrons</i>				0	1	0.00			
<i>Columbina pretiosa</i>				0	1	0.00			
<i>Columbina talpacoti</i>							1	19	5.26
<i>Crotophaga sulcirostris</i>				0	3	0.00	0	1	0.00
<i>Dendrocygna autonalis</i>							1	2	50.00
<i>Egretta alba</i>				0	1	0.00			
<i>Gallus gallus</i>	0	22	0.00	6	24	25.00	13	28	46.43
<i>Leptotila cassinii cerviniventris</i>	0	1	0.00						
<i>Manacus candei</i>	0	2	0.00						
<i>Melanerpes aurifrons</i>				0	2	0.00	0	1	0.00
<i>Pitangus sulphuratus</i>							0	1	0.00
<i>Quiscalus mexicanus</i>							1	1	100.00
<i>Sporophyla torqueola</i>							0	1	0.00
<i>Thryothorus maculipectus</i>	0	2	0.00						
<i>Troglodytes aedon</i>							0	2	0.00
<i>Turdus grayi</i>				0	7	0.00	0	3	0.00

ABRIL	Manabique			Machacas			Barrios		
	pos	N	%	pos	N	%	pos	N	%
<i>Centurus aurifrons</i>							0	1	0.00
<i>Chloroceryle aenea strituplera</i>				0	1	0.00			
<i>Columbina inca</i>	0	2	0.00						
<i>Columbina passerina</i>	0	2	0.00				0	1	0.00
<i>Columbina talpacoti</i>							0	8	0.00
<i>Crotophaga sulcirostris</i>				0	3	0.00			
<i>Dendrocygna autumnalis</i>							1	2	50.00
<i>Elaenia flavigaster</i>				0	1	0.00			
<i>Gallus gallus</i>	0	12	0.00	5	28	17.86	9	19	47.37
<i>Leptotila cassini</i>	1	1	100.00						
<i>Manacus candei</i>	0	2	0.00						
<i>Momotus momota</i>				0	1	0.00			
<i>Myiozetetes similis</i>	0	1	0.00	0	1	0.00			
<i>Quiscalus mexicanus</i>	0	1	0.00				1	5	20.00
<i>Thryothorus maculipectus</i>	0	1	0.00						
<i>Troglodytes aedon</i>							0	1	0.00
<i>Turdus grayi</i>				1	16	6.25	0	4	0.00

JUNIO	Manabique			Machacas			Barrios			
	Especie	pos	N	%	pos	N	%	pos	N	%
<i>Centurus aurifrons</i>				0	7	0.00	0	1	0.00	
<i>Columba cayennensis</i>							1	1	100.00	
<i>Columbina inca</i>	0	5	0.00				0	1	0.00	
<i>Columbina talpacoti</i>	0	1	0.00				0	3	0.00	
<i>Crotophaga sulcirostris</i>				0	3	0.00				
<i>Gallus gallus</i>	0	28	0.00	2	30	6.67	0	29	0.00	
<i>Glancidium brasilianum</i>				0	1	0.00				
<i>Icterus pectoralis</i>				0	1	0.00				
<i>Leptotila cassini</i>	0	1	0.00							
<i>Leptotila cassinii cerviniventris</i>	0	1	0.00							
<i>Molothrus aeneus</i>	0	1	0.00							
<i>Myiarchus tyrannulus</i>	0	1	0.00							
<i>Quiscalus mexicanus</i>							3	6	50.00	
<i>Thryothorus maculipectus umbrinus</i>	0	1	0.00							
<i>Thryothorus rufalbus</i>	0	1	0.00							
<i>Troglodytes aedon</i>							0	2	0.00	
<i>Turdus grayi</i>				1	15	6.67	2	10	20.00	
AGOSTO	Manabique			Machacas			Barrios			
Especie	pos	N	%	pos	N	%	pos	N	%	
<i>Attila spadiceus</i>	0	1	0.00							
<i>Chloroceryle americana septentrionalis</i>				0	1	0.00				
<i>Columbina inca</i>	0	1	0.00							
<i>Columbina plumbeiceps</i>				0	1	0.00				
<i>Columbina talpacoti</i>							0	1	0.00	
<i>Contopus cinereus</i>							0	1	0.00	
<i>Crotophaga sulcirostris</i>				0	2	0.00	0	1	0.00	
<i>Dendrocygna autumnalis</i>							1	2	50.00	
<i>Gallus gallus</i>	0	56	0.00	1	25	4.00	11	42	26.19	
<i>Leptotila cassini</i>	0	2	0.00							
<i>Leptotila p. plumbeiceps</i>	0	1	0.00							
<i>Pitangus sulphuratus</i>				0	1	0.00				
<i>Thryothorus maculipectus</i>	0	2	0.00							
<i>Troglodytes aedon</i>							0	2	0.00	
<i>Turdus grayi</i>				1	5	20.00	0	1	0.00	

E. Especies de aves muestreadas en cada sitio de trabajo.

ESPECIE	Machacas del Mar	Puerto Barrios	Punta de Manabique	Total
<i>Attila spadiceus</i>	0	0	1	1
<i>Centurus aurifrons</i>	7	2	2	11
<i>Chloroceryle americana septentrionalis</i>	2	0	0	2
<i>Chloroceryle aenea strituplera</i>	1	0	0	1
<i>Colaptes aurifrons</i>	1	0	0	1
<i>Columba cayennensis</i>	0	1	0	1
<i>Columbina inca</i>	0	1	9	10
<i>Columbina passerina</i>	0	1	2	3
<i>Columbina plumbeiceps</i>	1	0	0	1
<i>Columbina pretiosa</i>	1	0	0	1
<i>Columbina talpacoti</i>	0	31	1	32
<i>Contopus cinereus</i>	0	1	0	1
<i>Crotophaga sulcirostris</i>	11	2	0	13
<i>Dendrocygna autumnalis</i>*	0	6	0	6
<i>Egretta alba</i>	1	0	0	1
<i>Elaenia flavigaster</i>	1	0	0	1
<i>Gallus gallus</i>*	147	145	216	508
<i>Glancidium brasilianum</i>	1	0	0	1
<i>Icterus pectoralis</i>	1	0	2	3
<i>Leptotila cassini</i>	0	0	4	4
<i>Leptotila cassinii cerviniventris</i>	0	0	2	2
<i>Leptotila p. plumbeiceps</i>	0	0	1	1
<i>Manacus candei</i>	0	0	5	5
<i>Melanerpes aurifrons</i>	2	1	0	3
<i>Meleagris gallopavo</i>*	0	0	1	1
<i>Molothrus aeneus</i>	0	0	1	1
<i>Momotus momota</i>	1	0	0	1
<i>Myiarchus tyrannulus</i>	0	0	1	1
<i>Myiozetetes similis</i>	1	0	1	2
<i>Pitangus sulphuratus</i>	1	1	2	4
<i>Quiscalus mexicanus</i>	0	12	1	13
<i>Sporophyla torqueola</i>	0	1	0	1
<i>Thryothorus maculipectus</i>	0	0	5	5
<i>Thryothorus maculipectus umbrinus</i>	0	0	1	1
<i>Thryothorus rufalbus</i>	0	0	1	1
<i>Troglodytes aedon</i>	0	7	0	7
<i>Turdus grayi</i>	43	18	0	61
Total Aves Muestreadas:	223	230	259	712

* Las aves señaladas en negrillas corresponden a aves domesticas

F. Glosario.

- **Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm):** es el intermediario que representa a una hebra de un gen que codifica una proteína. Su región codificadora se relaciona a la secuencia de la proteína mediante el código genético (Lewin, 2004).
- **Anticuerpo monoclonal:** inmunoglobulinas producidas por un único clon de linfocitos B. Estos se producen usualmente al generar una célula productora de inmunoglobulinas al hibridizar una célula de mieloma no secretora con células del bazo (Janeway *et al.*, 2001).
- **Clado:** una agrupación de taxa derivadas de un único ancestro común (Strickberger, 2000).
- **Efecto citopático:** cambios visibles en la estructura celular, inducidos por una invasión viral. Por ejemplo: lisis celular, inflamación del núcleo, y formación de células fusionadas (Flint *et al.*, 2000).
- **Episomal (episoma):** elemento genético exógeno no necesario para la sobrevivencia de la célula. Se caracteriza por su capacidad de reproducirse integrándose a un cromosoma hospedero o por replicación autónoma (Flint *et al.*, 2000).
- **Epítipo:** es la porción de un antígeno reconocida por el receptor antigénico en un linfocito o las inmunoglobulinas que se generen en respuesta a él. Se le denomina también determinante antigénico (Lewin, 2004).
- **Placa de lisis:** área en un cultivo bacteriano donde desaparecen las bacterias por la actividad lítica del virus que se inocule (Lewin, 2004).
- **Taxa:** unidad taxonómica nombrada, consistente en un grupo de organismos, colocados en una categoría taxonomica (Strickberger, 2000).
- **Virión:** así se identifica a la partícula viral, sin hacer relación a la habilidad que tenga para infectar células y reproducirse (Lewin, 2004).