

# Prevalencia de infección por el virus del Nilo occidental en dos zoológicos del estado de Tabasco

Ana Hidalgo-Martínez, M en C,<sup>(1)</sup> Fernando I Puerto, M en C,<sup>(2)</sup> José Arturo Farfán-Ale, D en C,<sup>(2)</sup>  
Julián E García-Rejón, M en C,<sup>(2)</sup> Elsy del P Rosado-Paredes, QFB,<sup>(2)</sup> Jorge Méndez-Galván, M en C,<sup>(3)</sup>  
Raymunda Figueroa-Ocampo, Biól†,<sup>(1)</sup> Ikuo Takashima, PhD,<sup>(4)</sup> Celso Ramos, D en C.<sup>(1)</sup>

Hidalgo-Martínez A, Puerto FI, Farfán-Ale JA,  
García-Rejón JE, Rosado-Paredes EP, Méndez-Galván J,  
Figueroa-Ocampo R, Takashima I, Ramos C.  
Prevalencia de infección por el virus del Nilo occidental  
en dos zoológicos del estado de Tabasco.  
Salud Publica Mex 2008;50:76-85.

## Resumen

**Objetivo.** Determinar la prevalencia de infección por el virus del Nilo Occidental (VNO) en animales, mosquitos y personal que labora en dos zoológicos del estado de Tabasco, en México. **Material y métodos.** Con la utilización de ELISA de bloqueo se detectaron anticuerpos en sueros de animales: se buscó un fragmento del genoma del VNO por RT-PCR en el suero de animales, empleados y mosquitos. **Resultados.** En el zoológico "La Venta" se encontró una seroprevalencia de 25.67% (19/74) en aves y de 85.71% (6/7) en reptiles. En el zoológico "Yum-Ká", 31.25% (50/160) de las aves y 34.48% (16/29), de los mamíferos, tuvieron anticuerpos contra el VNO. En un grupo de mosquitos (*Culex quinquefasciatus*) se detectó el genoma del virus. **Conclusiones.** La detección de anticuerpos contra el VNO en animales de ambos zoológicos y del genoma viral en mosquitos demuestra la presencia del virus, lo cual representa un riesgo potencial de infección para animales y humanos.

Palabras clave: anticuerpos; virus del Nilo Occidental; animales de zoológico; México

Hidalgo-Martínez A, Puerto FI, Farfán-Ale JA,  
García-Rejón JE, Rosado-Paredes EP, Méndez-Galván J,  
Figueroa-Ocampo R, Takashima I, Ramos C.  
Prevalence of West Nile virus infection in animals  
from two state zoos Tabasco.  
Salud Publica Mex 2008;50:76-85.

## Abstract

**Objective.** To determine the prevalence of West Nile Virus (WNV) infection in animals, mosquitoes and employees from two zoos of Tabasco state, Mexico. **Material and Methods.** WNV antibodies were detected by blocking ELISA in serum samples from animals. Viral RNA was detected by RT-PCR from mosquitoes and serum samples from employees at "Yum-Ká" zoo. **Results.** Seroprevalence in birds was 25.65% (19/74) and 85% (6/7) in reptiles from "La Venta" zoo. Thirty-one percent of birds (50/160) and 34.48% mammals (16/29) at the "Yum-Ká" zoo, were seropositive. All human serum samples from Yum-ká zoo were negative by RT-PCR. A pool of mosquitoes (*Culex quinquefasciatus*) was positive for WNV. **Conclusions.** The presence of WNV antibodies in animals from both zoos and the detection of viral genome in mosquitoes demonstrate the presence of WNV in this region and indicates a potential risk of infection in animals and humans.

Key words: antibodies; West Nile Virus; zoo; Mexico

(1) Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México.

(2) Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

(3) Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, Secretaría de Salud. México, DF.

(4) Laboratory of Public Health, Department of Environmental Veterinary Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University. Sapporo, Japan.

† In memoriam

Fecha de recibido: 20 de marzo de 2007 • Fecha de aceptado: 21 de septiembre de 2007

Solicitud de sobretiros: Dr. Celso Ramos. Departamento de Arbovirus. Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas.  
Instituto Nacional de Salud Pública. Av. Universidad 655, col. Santa María Ahuacatlán. 62508 Cuernavaca, Morelos.

Correo electrónico: cramos@insp.mx

El virus del Nilo Occidental (VNO), perteneciente al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y que forma parte del serocomplejo de la Encefalitis Japonesa,<sup>1</sup> se transmite por la picadura de mosquitos, particularmente del género *Culex* sp. Su ciclo biológico (enzoótico) en la naturaleza se mantiene entre mosquitos infectados y aves susceptibles; sin embargo, puede transmitirse a una diversidad de especies, sobre todo mamíferos, reptiles y seres humanos.<sup>1-3,4</sup> Recientemente se han reconocido otras vías de transmisión, en particular por transfusión sanguínea, transplacentaria, leche materna, trasplantes de órganos y accidentes de laboratorio.<sup>5-11</sup>

En 1937, en el distrito de West Nile, en Uganda, se detectó y aisló por primera vez el VNO.<sup>12</sup> La fiebre que ocasiona (FVNO) constituye hoy en día una enfermedad ampliamente distribuida en países de África, Asia, Europa y Australia.<sup>13-20</sup> En 1999 se descubrió la circulación del virus en América y actualmente hay evidencia de infección en animales en varios países de Centroamérica, el Caribe y Sudamérica.<sup>21-27</sup>

La mayoría de las personas infectadas con el VNO, presentan un cuadro febril, y alrededor de 1% desarrollan alteraciones del sistema nervioso central, sobre todo los adultos mayores.<sup>28-30</sup> En 1999, se presentaron en Nueva York los primeros casos de FVNO, incluyendo pacientes con encefalitis, y se notificaron una diversidad de animales infectados, en particular equinos y aves. Hoy en día la infección se ha distribuido en todo el territorio de los Estados Unidos (EUA), donde se han notificado más de 16 000 casos en humanos y una cifra considerable en animales domésticos y silvestres.<sup>30-33</sup>

Se desconoce la forma en que el VNO se transmite de una región a otra; sin embargo, se propone que las aves migratorias puedan tener un papel importante en la introducción y diseminación del virus.<sup>34</sup> En el ciclo enzoótico, la infección generalmente no causa la muerte de las aves,<sup>35</sup> no obstante, en algunas aves susceptibles, como el cuervo americano, se pueden producir viremias elevadas que permiten la diseminación del virus a otras especies, incluyendo al hombre.<sup>36-38</sup> El ciclo de transmisión del VNO es complejo e implica varios factores como la densidad de la población de aves susceptibles, la capacidad de replicación, transmisión y densidad de población de los mosquitos vectores, las condiciones climáticas y la susceptibilidad de los huéspedes, entre otros.<sup>38-39</sup>

Por su situación geográfica, México representa una zona de riesgo; algunos de los factores que contribuyen a ello son la movilización de personas en la frontera con los EUA, la abundancia de mosquitos transmisores del virus y las rutas de aves migratorias provenientes del norte del continente americano que encuentran sitios

de anidamiento y reposo en algunas zonas del país o en otras regiones del continente.

El comportamiento de la transmisión del VNO en México difiere de lo observado en los EUA, ya que a pesar de existir un sistema de vigilancia epidemiológica en seres humanos y animales, no existen técnicas de diagnóstico adecuadas para uso en humanos y la infraestructura (Laboratorios de Seguridad Biológica) para el aislamiento del virus es insuficiente.

Diversos estudios realizados en México han notificado prevalencias elevadas de anticuerpos contra VNO, en particular en aves y equinos.<sup>40-42</sup> Actualmente, el número de casos en seres humanos es reducido y no se han informado casos con afectación neurológica o muerte. En 2003 se publicó el aislamiento del VNO de un cuervo (*Corvus corax*) del zoológico Yum-Ká de Villahermosa, Tabasco<sup>43</sup> que realizara la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA), en colaboración con el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Por otro lado, en 2004 se aisló y secuenció el VNO de una paciente febril del estado de Sonora, sin síntomas neurológicos.<sup>44</sup>

Los zoológicos ubicados en zonas endémicas o de riesgo son sitios adecuados para el monitoreo del VNO, ya que los animales que ahí se encuentran están expuestos a la picadura de mosquitos. En 2001 se propuso un sistema de vigilancia epidemiológica donde participaron 64 zoológicos de 34 estados de los EUA; se obtuvieron datos importantes sobre los principales mosquitos vectores del virus y las especies animales susceptibles a la infección, lo cual permitió fortalecer las acciones de prevención y control.<sup>45</sup>

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de infección por VNO en animales, mosquitos y personal que labora en dos zoológicos del estado de Tabasco, México.

## Material y métodos

### Área de estudio

Diversos trabajos han demostrado que la mayoría de las infecciones causadas por el VNO ocurren en el verano, o bien, al inicio del otoño.<sup>30,46</sup> Este estudio se llevó a cabo en el estado de Tabasco, al sureste de México, donde se presenta una precipitación media anual de 2 750 mm y se distinguen tres tipos de clima: cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (Am); cálido húmedo con lluvias todo el año (Af), y cálido sub-húmedo con lluvias en verano (Cs). Se llevó a cabo un muestreo bietápico (mayo y octubre de 2005) en dos zoológicos: a) el Parque-

Museo La Venta, con una superficie de ocho hectáreas, y ubicado a orillas de la Laguna de las Ilusiones, en la ciudad de Villahermosa, situado a 18°00'04'' N, 92°52'07'' W (coordenadas de Global Positioning System, GPS 12 marca GARMIN), y b) el Centro de Interpretación y Convivencia con la Naturaleza (CICN) Yum-Ká, situado a 17 Km de Villahermosa, (GPS 18°00'22'' N, 92°48'30'' W), con una superficie de 101 hectáreas que representa los tres principales ecosistemas de Tabasco (selva, sabana y lagunas) y donde se encuentran diversas especies animales en vida silvestre.

### Colección de muestras biológicas

Para la colecta de las muestras, los investigadores del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), en Mérida, Yucatán, y del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), en Cuernavaca, Morelos, solicitaron por escrito la autorización de los directores de ambos zoológicos. Se explicó el objetivo del estudio y se estableció el compromiso de entregar los resultados del estudio. Se colectaron muestras sanguíneas de 74 de las 100 aves y de los siete reptiles del zoológico La Venta. En el zoológico Yum-Ká se obtuvieron 160 muestras de 232 aves, y otras 29 de 335 mamíferos; ninguno de los animales manifestó enfermedad alguna en los tres meses previos a la toma de la muestra.

De acuerdo con los procedimientos aprobados por las comisiones de Ética y Bioseguridad del INSP, en la obtención de la muestra de sangre de cada animal o persona se utilizó material estéril desechable. Las muestras se colocaron en tubos estériles y el suero se separó por centrifugación a 1 500 rpm durante 10 minutos, a 4° C. En los casos donde la muestra de sangre de algunas aves fue escasa, ésta se diluyó 1:5 en PBS estéril que contenía 1.5% de albúmina bovina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 250 µg/ml de amfotericina B. Personal del INSP transportó las muestras en contenedores cerrados a 4° C, en condiciones estandarizadas de bioseguridad y almacenadas a -70° C hasta su procesamiento en el Departamento de Arbovirus del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del INSP en Cuernavaca, Morelos.

Se colectaron muestras sanguíneas de 55 de los 100 trabajadores del zoológico Yum-Ká que aceptaron participar en este estudio. Los trabajadores fueron informados del objetivo del estudio y de los posibles riesgos en la toma de la muestra; posteriormente, firmaron una carta de consentimiento aprobado por la Comisión de Ética del INSP. Ninguno de los participantes manifestó tener alguna condición de salud que impidiera la toma de la muestra; por otro lado, se

estableció el compromiso de entregar oportunamente los resultados del estudio y de mantener la confidencialidad de los mismos. No se obtuvieron muestras de suero de trabajadores del zoológico "La Venta", debido a que decidieron no participar en el estudio.

En los dos periodos de muestreo se colocó una trampa automática (Mosquito Magnet, Modelo "Liberty", Rhode Island, EUA) durante 24 horas, por siete días, cerca de las áreas donde se encontraban los animales de ambos zoológicos incluidos en el estudio. Después se identificaron el género, la especie y el sexo de los mosquitos colectados, de acuerdo con las claves dicotómicas de Darsie y Carpenter<sup>47-48</sup> y se formaron grupos de cerca de 35 mosquitos que se conservaron en crioviales y se transportaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento en el Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la UADY, en Mérida, Yucatán.

### Detección de anticuerpos contra el VNO mediante la técnica de ELISA de bloqueo

La técnica de ELISA de bloqueo se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Blitvich y colaboradores.<sup>49,50</sup> Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano (Costar, Mod 3590), que fueron sensibilizadas con el antígeno del VNO mediante incubación durante 24 horas a 4° C; se añadieron 100 µl de antígeno por pozo, diluido 1:1 000 en amortiguador de carbonatos, pH 9.0. La placa se lavó cuatro veces con 250 µl de PBS, pH 7.4 que contiene Tween 20 al 0.1%. Posteriormente, se agregaron 200 µl de amortiguador de bloqueo (PBS que contiene 5% de leche descremada) y se incubaron por 40 minutos a 37° C. Se retiró el amortiguador de bloqueo y se añadieron 50 µl de los sueros diluidos 1:10 en PBS; o 1:5 de las aves, la placa se incubó por dos horas a 37° C y se lavó cuatro veces con 250 µl de PBS, pH 7.4 que contiene Tween 20 al 0.1%. Se agregaron 50 µl del anticuerpo monoclonal 3.1112G dirigido contra la proteína NS1 del VNO (Chemicon Internacional, Temecula, CA, EUA) diluido 1:2 000 en amortiguador de bloqueo y se incubó por una hora a 37° C. La placa se lavó cuatro veces y se agregaron 50 µl de anticuerpo anti-ratón (IgG) marcado con peroxidasa (Zymed), diluido 1:2 000 en amortiguador de bloqueo y se incubó durante una hora a 37° C. Posteriormente, se lavó con PBS pH 7.4 que contiene Tween 20 al 0.1% y se agregaron 75 µl del sustrato ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]) (KPL, Gaithersburg, MD, EUA); la placa se incubó de 7 a 12 minutos a 37° C. La densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 405nm en un lector de ELISA (marca OpsysMR). Los sueros se analizaron por duplicado y el ensayo se repitió

por lo menos dos veces. El Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la UADY proporcionó los sueros controles positivos y negativos de diversos animales.

El doctor José Arturo Farfán, del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, donó el antígeno utilizado en este estudio. Por otra parte, algunos datos fueron confirmados con un antígeno preparado por uno de los autores de este trabajo, en la Universidad de Hokkaido, en Sapporo, Japón, siguiendo el procedimiento descrito por Blitvich y colaboradores.<sup>49</sup>

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula: % de Inhibición =  $100 - (TS-B)/(CS-B) \times 100$ , donde TS = densidad óptica del suero problema, CS = densidad óptica del suero control negativo, B = densidad óptica del "fondo". Se consideró como positivo un suero con valor de inhibición  $\geq 30\%$  de acuerdo con lo descrito por Blitvich y colaboradores.<sup>49-50</sup> Los resultados de esta técnica son comparables a los que se obtienen por el método de neutralización por reducción de placa lítica (Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT).<sup>49</sup>

### Extracción de ARN y detección de ARN viral por RT-PCR

La extracción del ARN total de las muestras de los sueros se hizo de acuerdo con protocolo descrito en el kit de extracción QIAamp viral de Qiagen (Qiagen Inc, Valencia CA, EUA). El ARN de los mosquitos se extrajo siguiendo las instrucciones del Mini kit RNeasy de Qiagen.

En el Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la UADY se llevó a cabo el procedimiento de RT-PCR en dos pasos, de acuerdo con la descripción de Lanciotti y colaboradores.<sup>51</sup> Se utilizaron 5  $\mu$ l de ARN y los siguientes oligonucleótidos (50 pmol): sentido 5'-TTGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTT-3' (233 a 257 nt) y antisentido 5'-CAGCCGACAGCACTGGACA-TTCATA-3' (640 a 616 nt) que flanquean una región de 408 pb entre los genes de la proteína de la cápside (C) y de la pre-membrana (prM). La reacción de Transcriptasa Reversa (RT) se llevó a cabo del modo siguiente: desnaturalización: un minuto a 95° C; alineamiento: dos minutos a 42° C; amplificación: 50 minutos a 42° C y un ciclo adicional de 15 minutos a 70° C para inactivar la enzima. Para la reacción de PCR se utilizó el siguiente esquema: desnaturalización: un minuto a 95° C, 35 ciclos (alineamiento: un minuto a 50° C; amplificación: dos minutos a 72° C) y una extensión final de ocho minutos a 72° C. Como control positivo se utilizó un plásmido

con genes que codifican para una región de la proteína de la cápside y de pre-membrana (prM) del VNO (pCR®4-TOPO® (TOPO TA Cloning Kit for sequencing, Invitrogen). El producto amplificado fue de 408 pb y se observó en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

## Resultados

### Seroprevalencia de VNO en animales del zoológico La Venta

Durante el mes de mayo de 2005 se tomaron muestras sanguíneas de 24 aves correspondientes a 10 géneros y 12 especies, de las cuales 5 (20.83%) fueron positivas; por otra parte, 6 de 7 reptiles de la especie (*Crocodylus moreletti*) (85.71%) presentaron anticuerpos contra VNO. En octubre de 2005 se colectaron 50 muestras de aves correspondientes a 10 géneros y 13 especies; 14 (28%) muestras de aves presentaban anticuerpos contra el virus (cuadro I).

### Seroprevalencia de VNO en animales del zoológico Yum-Ká

Se obtuvieron 87 muestras de sangre de aves correspondientes a 19 géneros y 22 especies durante mayo de 2005; 25 (28.73%) de las aves tenían anticuerpos contra VNO (cuadro II). Asimismo, en esa etapa se analizaron 21 muestras de mamíferos pertenecientes a 10 géneros y 11 especies, de los cuales 10 (47.61%) fueron positivos a anticuerpos contra VNO (cuadro II). En octubre de 2005 se tomaron muestras sanguíneas de 73 aves (13 géneros, 17 especies), de las cuales 25 (34.24%) fueron positivas (cuadro III); en el mismo mes, 6 (75%) de los ocho mamíferos a los que se les tomó sangre presentaron anticuerpos contra el VNO (cuadro III).

En el análisis estadístico de las seroprevalencias entre los zoológicos y las etapas de muestreo, a pesar que existe mayor número de animales positivos en el zoológico Yum-Ká comparado con La Venta, la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.32$ ).

### Muestras de sueros de aves, mamíferos y reptiles analizadas por RT-PCR

Se analizaron 234 muestras de sueros de aves, 29 de mamíferos y 7 de reptiles correspondientes a 37, 11 y 1 especies, respectivamente. No se detectó la presencia del genoma del virus en ninguna de las muestras analizadas.



**Cuadro I**  
**AVES Y REPTILES MUESTREADOS. ZOOLÓGICO LA VENTA,**  
**VILLAHERMOSA, TABASCO, MÉXICO.**  
**MAYO Y OCTUBRE DE 2005**

Nombre común	Nombre científico	Positivos/analizados
Mayo -aves		
Loro frente blanca	<i>Amazona albifrons</i>	2
Loro cabeza azul	<i>Amazona farinosa</i>	1/6
Pelicano blanco	<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>	2/2
Loro frente roja	<i>Amazona autumnales</i>	2
Aracari	<i>Pteroglossus aracari</i>	2
Perico azteca	<i>Aratinga nana</i>	2
Guacamaya roja	<i>Ara macao</i>	2
Tucán azufrado	<i>Ramphastos sulfuratus</i>	1
Halcón	<i>Buteo albicaudatus</i>	1
Halcón negro común	<i>Buteogallus anthracinus</i>	1
Zopilote rey	<i>Sarcoramphus papa</i>	1
Quebranta huesos	<i>Caracara plancus</i>	2/2
Octubre-aves		
Loro frente blanca	<i>Amazona albifrons</i>	2/8
Loro cabeza azul	<i>Amazona farinosa</i>	3
Loro cachete amarillo	<i>Amazona autumnales</i>	3
Pijije	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	1/4
Pelicano blanco	<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>	1/1
Pelicano gris	<i>Pelecanus occidentalis</i>	2/2
Pato Pekín	<i>Ana platyrhynchos</i>	4/5
Aracari	<i>Pteroglossus aracari</i>	3
Chachalaca	<i>Ortalis vetula</i>	1/6
Guacamaya verde	<i>Ara militaris</i>	1/3
Loro pecho sucio	<i>Aratinga nana aztek</i>	4
Tucán	<i>Ramphastos sulfuratus</i>	1
Pato real mexicano	<i>Cairina moschata</i>	2/7
Total		19/74 (25.67%)
Mayo - reptiles		
Cocodrilo	<i>Crocodylus moreletii</i>	6/7 (85.71%)

### Mezcla de mosquitos analizados por RT-PCR

Se capturaron 1 202 mosquitos que se clasificaron taxonómicamente y se agruparon en 35 mosquitos (cuadro IV). En un grupo de mosquitos *Culex quinquefasciatus* capturados en el zoológico Yum-Ká en octubre de 2005, se detectó un fragmento de 408 pb del genoma de VNO (figura 1).

### Muestras de sueros de humanos analizadas por RT-PCR

A través de la técnica de RT-PCR se analizaron las muestras de suero de 55 empleados del zoológico Yum-

**Cuadro II**  
**AVES Y MAMÍFEROS MUESTREADOS. ZOOLÓGICO YUM-KÁ,**  
**VILLAHERMOSA, TABASCO, MÉXICO. MAYO 2005**

Nombre común	Nombre científico	Positivos/analizados
Aves		
Loro cachete amarillo	<i>Amazona autumnalis</i>	1/5
Loro frente blanca	<i>Amazona albifrons</i>	5
Loro cabeza azul	<i>Amazona farinosa</i>	1/2
Loro corona blanca	<i>Pionus senilis</i>	1/5
Hocofaisán	<i>Crax rubra</i>	2/6
Ganso egipcio	<i>Alopochen aegyptiacus</i>	3/14
Pijije	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	2/6
Ganso canadiense	<i>Branta canadensis</i>	3/3
Ganso chino	<i>Anser cygnoides</i>	1/1
Faisán de collar	<i>Phasianus colchicus</i>	1/1
Faisán dorado	<i>Phasianus colchicus</i>	1
Pava corolita	<i>Penélope purpurascens</i>	1/2
Pato carolina	<i>Aix sponsa</i>	2
Perdiz chucar	<i>Alectoris chucar</i>	1
Algarabi	<i>Dendrocygna bicolor</i>	1
Pelicano blanco	<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>	1/1
Cisne negro	<i>Cygnus atratus</i>	1
Pavo real	<i>Pavo cristatus</i>	2/3
Faisán plateado	<i>Lophura nycthemera</i>	1
Gallina guinea	<i>Numida meleagris</i>	2
Pato cimarrón	<i>Cairina moschata</i>	3/19
Pato Pekín	<i>Ana platyrhynchos</i>	2/4
Cuervo	<i>Corvus brachyrhynchos</i>	1/1
Total		25/87 (28.73%)
Mamíferos		
Antílope	<i>Taurotragus oryx</i>	1
Tigrillo	<i>Leopardos wiedii</i>	2/2
Jaguarundi	<i>Herpailurus yaguarondi</i>	3/3
Chivo negro	<i>Capra waliae</i>	3
Burro siciliano	<i>Equus asinus asinus</i>	2/2
Antílope cuello negro	<i>Antelope cervicapra</i>	4
Tigre	<i>Pantera tigris</i>	1/1
Jaguar	<i>Pantera onca</i>	1/1
Guanaco	<i>Lama guanicoe</i>	1/1
Antílope acuático	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	1
Mapache	<i>Procyon lotor</i>	2
Total		10/21 (47.61%)

Ká -8 (16.37%) de mujeres y 46 (83.63%) de hombres- y en ninguna se detectó el genoma del virus.

## Discusión

La infección ocasionada por el VNO constituye hoy en día un problema de salud pública en los EUA y el Sur de Canadá,<sup>52,53</sup> donde muchos de los enfermos presentan alteraciones neurológicas. Algunos estudios serológicos

Cuadro III

**AVES Y MAMÍFEROS MUESTREADOS. ZOOLÓGICO YUM-KÁ, VILLAHERMOSA, TABASCO, MÉXICO. OCTUBRE 2005**

Nombre común	Nombre científico	Positivos/analizados
<b>Aves</b>		
Loro cachete amarillo	<i>Amazona autumnalis</i>	7
Loro cabeza amarilla	<i>Amazona ochrocephala</i>	1
Loro frente blanca	<i>Amazona albifrons</i>	1
Loro corona blanca	<i>Pionus senilis</i>	2
Ganso egipcio	<i>Alopochen aegyptiacus</i>	6
Pijije	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	2/4
Ganso canadiense	<i>Branta canadensis</i>	3/3
Ganso chino	<i>Anser cygnoides</i>	1/1
Pato carolina	<i>Aix sponsa</i>	1
Faisán plateado	<i>Lophura nycthemera</i>	1/1
Pato cimarrón	<i>Cairina moschata</i>	13/32
Zacua mayor	<i>Psarocolius montezuma</i>	1/1
Guacamaya escarlata	<i>Ara macao</i>	2/5
Guacamaya azul	<i>Ara ararauna</i>	1/2
Chachalaca	<i>Ortalis vetula</i>	1/2
Loro africano	<i>Psittacus erithacus</i>	2
Pato algarabi	<i>Dendrocygna bicolor</i>	2
<b>Total</b>		<b>25/73 (34.24%)</b>
<b>Mamíferos</b>		
Chivo negro	<i>Capra waliae</i>	2/2
Burro siciliano	<i>Equus asinus asinus</i>	1/1
Antílope cuello negro	<i>Antelope cervicapra</i>	3/3
Mapache	<i>Procyon lotor</i>	2
<b>Total</b>		<b>6/8 (75%)</b>

realizados en Centroamérica, el Caribe y Sudamérica indican la presencia del virus principalmente en aves y caballos.<sup>21-27</sup> En México, la infección por VNO se conoce por estudios llevados a cabo principalmente en aves, equinos y mosquitos.<sup>40-42</sup> Hasta la fecha se han aislado y caracterizado genéticamente una variedad de virus de seres humanos, animales y mosquitos.<sup>40-44,54,55</sup>

Los zoológicos incluidos en este estudio se encuentran ubicados en sitios donde la densidad vectorial y el flujo de aves migratorias susceptibles a la infección son considerables, lo cual representa un riesgo de infección por VNO en diversas especies.

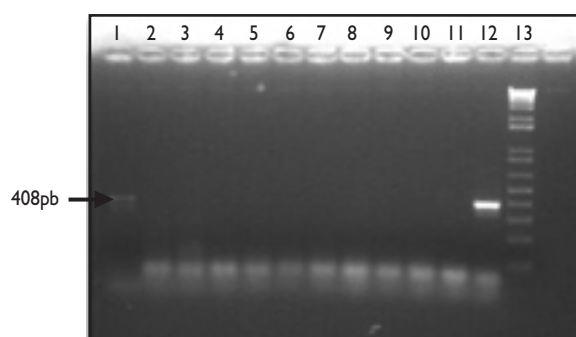
Los datos de este estudio indican que la prevalencia de anticuerpos contra el VNO en las aves de dos zoológicos del estado de Tabasco fue de 29.48%, cifra que difiere con las de otros estudios similares; así, Farfán-Ale

Cuadro IV

**MOSQUITOS CAPTURADOS EN DOS ZOOLÓGICOS DE VILLAHERMOSA, TABASCO. MÉXICO, 2005**

Género	Especie	Sexo	# Mosquitos
<i>Culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	H	424
<i>Culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	M	72
<i>Anopheles</i>	<i>punctimacula</i>	H	18
<i>Ochlerotatus</i>	<i>taeniorhynchus</i>	H	304
<i>Psorophora</i>	<i>ciliata</i>	H	420
<b>Total</b>			<b>1202</b>

y colaboradores informaron una prevalencia de 2.7% en aves del zoológico de Mérida, Yucatán.<sup>56</sup> Los hallazgos del presente estudio coinciden con otros informes en los cuales se ha detectado una seroprevalencia elevada (34%) en aves en cautiverio en los EUA.<sup>57</sup> Asimismo, estudios realizados en 2003 por CPA en aves del zoológico Yum-Ká arrojaron una prevalencia de anticuerpos de 30% (SAGARPA/CPA). Por otro lado, también se han notificado prevalencias elevadas de anticuerpos contra el VNO en diferentes especies de mamíferos en cautiverio, como es el caso del zoológico del Bronx en Nueva York, EUA, donde 8% de los mamíferos muestreados tuvieron anticuerpos contra VNO;<sup>57</sup> este dato contrasta con el hallazgo de este estudio que fue de 34.48% en ambos zoológicos del estado de Tabasco, y



Carril 1 grupo de mosquitos (*Culex quinquefasciatus*) positivo; carril 2-10 grupo de mosquitos negativos; carril 11 control negativo; carril 12 control positivo (plásmido pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>); carril 13 marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder)

**FIGURA 1. GENOMA DEL VNO EN UN GRUPO DE MOSQUITOS (CULEX QUINQUEFASCIATUS) CAPTURADOS EN EL ZOOLÓGICO YUM-KÁ, VILLAHERMOSA, TABASCO. OCTUBRE 2005**

del estudio realizado en el zoológico de Mérida, Yucatán, donde sólo 3.8% de los mamíferos tuvieron anticuerpos contra el virus.<sup>56</sup> Una posible explicación de la elevada prevalencia de infección en los mamíferos analizados en este estudio es que están ubicados en sitios donde el VNO, además de haber sido detectado, seguramente ha persistido, ya que en 2003 se aisló el virus de un cuervo muerto del zoológico Yum-Ká,<sup>43</sup> y estudios realizados por CPA en el mismo año analizaron 166 equinos de los ejidos aledaños a ese zoológico, de los cuales 83 (50%) presentaron anticuerpos contra VNO, sin tener antecedentes de vacunación (SAGARPA/CPA). Por otra parte, el zoológico Yum-Ká está inserto en un sitio de anidamiento de aves migratorias, rodeado de grandes lagunas y cuenta con una gran diversidad de flora y fauna, además de que abundan los mosquitos potencialmente vectores del virus.

Cabe destacar que en algunos mamíferos (*Capra walie* y *Antilope cervicapra*) se observó una seroconversión cinco meses después de la primera toma; en 2003, la CPA notificó cuatro burros sicilianos (*Equus asinus asinus*) del zoológico Yum-ká negativos a anticuerpos contra VNO y, tres años después, en la presente investigación, se detectaron anticuerpos contra el virus en uno de esos animales, lo cual confirma la circulación del VNO en el zoológico Yum-Ká. Otros estudios realizados en Egipto y los EUA han notificado seroconversión en diferentes especies de animales.<sup>46,58,59</sup>

Otros hospederos accidentales de la infección por el VNO son los reptiles:<sup>60</sup> en 2001-2002 se notificó que más de mil lagartos (*Alligator mississippiensis*) murieron a causa de una infección con el VNO en una granja de Georgia, EUA (60); en 2003, en una granja del municipio de Paraíso, estado de Tabasco, 67% de los reptiles analizados (*Crocodylus moreletii*) presentaron anticuerpos contra el VNO. Adicionalmente, la Subsecretaría de Agricultura y Ganadería del estado de Tabasco notificó en 2003 una diversidad de lagartos enfermos y fallecidos en los municipios de Centla y Centro, en dos de los cuales la CPA detectó el VNO por RT-PCR. Otros estudios similares realizados por el Instituto Politécnico Nacional, CPA y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) confirman la presencia de anticuerpos y virus en cocodrilos de Chiapas (UMA Cocodrilos de Chiapas S.A. de C.V, Tapachula, Chiapas) y Oaxaca (Centros para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre, Chachahua, San Pedro Tututepec, Oaxaca). En el presente estudio la prevalencia de anticuerpos contra VNO en los reptiles analizados (*Crocodylus moreletii*) (85.71%), es similar a la observada en cocodrilos de una granja de Ciudad del Carmen, Campeche (México) donde 86% de las muestras analizadas tuvieron anticuerpos contra el virus.<sup>56</sup>

Una posible explicación de estos hallazgos es que los cocodrilos pueden ser amplificadores del virus, como lo demostraron Klenk y colaboradores.<sup>61</sup> Sin embargo, Jacobson y colaboradores notificaron títulos bajos de anticuerpos en *Alligator mississippiensis*.<sup>62</sup> Una posible vía de infección de los reptiles en cautiverio podría ser a través de la alimentación con carne de gallinas, pollos o caballos infectados, como lo informaran Miller y colaboradores.<sup>60</sup>

Los primeros estudios que implicaron a los mosquitos como vectores del VNO se llevaron a cabo en Egipto durante 1952-1954,<sup>35,46</sup> y confirmados posteriormente en Sudáfrica, Israel, Francia, India y Pakistán, de tal manera que se pudo definir su papel en la transmisión y diseminación del virus.<sup>63-67</sup>

Debido a la información limitada sobre los vectores que participan en la transmisión del VNO en México, actualmente se desconocen los vectores más eficientes y que pudieran tener un papel importante en la transmisión del virus en México. En este estudio se detectó un fragmento del genoma del virus (408 bp) en un grupo de mosquitos (*Culex quinquefasciatus*) colectados en el zoológico Yum-Ká en octubre de 2005. Dicho hallazgo requiere confirmación mediante la secuencia de nucleótidos del fragmento, a fin de ubicar al virus en alguno de los dos linajes conocidos; así, los virus que pertenecen al linaje II se han aislado en áreas endémicas y aquellos del linaje I se han asociado con brotes epidémicos y casos severos de encefalitis.<sup>69</sup> De acuerdo con la información disponible, el VNO se ha aislado en más de 43 especies de mosquitos de 11 géneros. Los *Cx. pipiens*, *Cx. restuans* y *Cx. quinquefasciatus* son los vectores más eficientes en el mantenimiento del virus en EUA.<sup>68</sup> La presencia del virus en una gran diversidad de mosquitos en la unión americana puede ser una explicación de la rápida dispersión del virus, ya que a la fecha se han notificado más de 16 000 casos de infección por VNO y más de 800 muertes en seres humanos.<sup>59</sup>

En México las manifestaciones clínicas de los casos diagnosticados por técnicas serológicas han sido leves<sup>44</sup> y contrastan con las manifestaciones clínicas de los pacientes notificados en EUA, donde prevalecen las afectaciones neurológicas e, inclusive, la ocurrencia de casos fatales.<sup>31-33</sup> En este estudio sólo se analizaron sueros de trabajadores del zoológico Yum-ká; sin embargo, no se identificó el genoma del virus en ninguna de las muestras. No se hizo la búsqueda de anticuerpos contra el VNO en los sueros de humanos debido a que no existen procedimientos serológicos aceptables y accesibles.

La detección de anticuerpos contra el VNO en animales de ambos zoológicos del estado de Tabasco y del fragmento del genoma del virus en mosquitos,

demuestra la persistencia del virus en la región, y es un indicador de riesgo de infección tanto para humanos como para animales domésticos y silvestres. Por esta razón es importante fortalecer la vigilancia epidemiológica del VNO en zonas de riesgo en el país, ya que las condiciones climáticas y la abundancia de mosquitos vectores y de animales susceptibles pueden permitir y facilitar la dispersión del virus a otras regiones de México. De igual manera, es importante el aislamiento y caracterización genética del virus a fin de explicar el comportamiento epidemiológico de la infección en México. A pesar de que en México se reconoce la presencia del virus desde el año 2002, no han ocurrido brotes de la magnitud que se notifican en otras naciones.<sup>43</sup> En un estudio reciente que llevarán a cabo los autores del presente trabajo, se demostró la presencia de anticuerpos contra el VNO en quirópteros capturados en Jalisco y Veracruz, México, que confirma la presencia del virus en nuestro país en una diversidad de animales.

En diversas instituciones gubernamentales mexicanas, como el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE/SSA), la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la SEMARNAT y la CPA, han tomado acuerdos para activar el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal, con el objeto de vigilar, diagnosticar, prevenir y controlar al virus del Nilo Occidental (Diario Oficial de la Federación, 14 de julio 2003).

Por esta razón, es importante fortalecer la vigilancia epidemiológica del VNO en México, incluyendo los zoológicos, particularmente aquellos ubicados en áreas de riesgo, a fin de prevenir la transmisión y diseminación a los animales y al hombre.

### Agradecimientos

Este trabajo está dedicado a la memoria de la compañera bióloga Raymunda Figueroa Ocampo. Por otra parte, se agradece al personal del Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, de la Universidad Autónoma de Yucatán, por su valiosa colaboración; a la bióloga Rosa Carmina Cetina Trejo, por su invaluable y desinteresada ayuda en el procesamiento de las muestras; al licenciado Jesús Gallegos de la O, Director del Parque-Museo La Venta por las facilidades brindadas en la realización del presente estudio; a los biólogos José Hernández de la Cruz y Jorge González Aceff, así como a los médicos veterinarios zootecnistas Juan Carrera Flores, Cristel Pérez Arévalo, Ramón Quevedo Giorgana, Cynthia Zarazúa González y Eduardo Martín López, por su apo-

yo en la toma de muestras. A Laura Palacios Córdova, médica veterinaria zootecnista y Directora del zoológico Yum-Ká se agradece su apoyo para llevar a cabo esta investigación, al igual que a todos los empleados de los zoológicos donde se tomaron las muestras. Por último, se agradecen los valiosos comentarios del doctor Roberto Navarro (Región 6 de la CPA, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas), que enriquecieron este trabajo.

Esta investigación fue financiada parcialmente con un donativo de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los EUA (Grant. No. 4632-2/4631).

### Referencias

1. Anderson JF, Andreadis TG, Vossbrinck CR, Tirrell S, Wakem EM, French RA, et al. Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut. *Science* 1999;286:2331-2333.
2. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 1999;286:2333-2337.
3. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever: A reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 1999;5:643-650.
4. Kauffman EB, Jones SA, Dupuis II AP, Ngo KA, Bernard KA, Kramer LD, et al. Virus detection protocols for West Nile virus in vertebrate and mosquito specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:3661-3667.
5. Kumar D, Prasad GV, Zaltzman J, Levy GA, Humar A. Community-acquired West Nile virus infection in solid-organ transplant recipients. *Transplantation* 2004;77:399-402.
6. De Salvo D. West Nile virus encephalitis in organ transplant recipients: another high risk group for meningoencephalitis and death. *Transplantation* 2004;77:466-469.
7. Iwamoto M. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 2003;348:2196-2203.
8. Julander JG, Winger QA, Rickords LF, Shi PY, Tigner M, Binduga-Gajewska I, et al. West Nile virus infection of the placenta. *Virol* 2006;347:175-182.
9. Laboratory-acquired West Nile virus infections-United States. *MMWk Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:1133-1135.
10. Possible West Nile virus transmission to an infant through breastfeeding - Michigan. *MMWk Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:877-878.
11. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL. Transmission of West Nile Virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med* 2003;349:1236-1245.
12. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. Aneurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 1940;20:471-492.
13. Work TH, Hurlbut HS, Taylor RM. Isolation of West Nile virus from hooded crow and rock pigeon in the Nile delta. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;84:719-722.
14. Work TH, Hurlbut HS, Taylor RM. Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am J Trop Med Hyg* 1955;4:872-888.
15. Hurlbut HS, Rizk F, Taylor RM, Work TH. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 1956;5:579-620.
16. Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, et al. West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1372-1378.



17. Durand B, Chevalier V, Pouillot R, Labie J, Marendat I, Murgue B, et al. West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: results of a serosurvey. *Emerg Infect Dis* 2002;8:777-782.
18. Miller BR, Nasci RS, Godsey MS, Savage HM, Lutwama JJ, Lanciotti RS, et al. First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62:240-246.
19. Studdert MJ. West Nile virus revisited and other mosquito borne viruses of horses in Australia. *Aust Vet J* 2003;81:56-57.
20. Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina OY, Tyutyunnik EN, Frolochkina TI, Lanciotti RS, et al. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis* 2001;7:128-132.
21. Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, García JB, Vissani A, Trono K, et al. West Nile Virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1559-1561.
22. Pupo M, Guzmán MG, Fernández R, Llop A, Dickinson FO, Perez D, et al. West Nile Virus infection human and horses, Cuba. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:1022-1024.
23. Komar N, Clark GG. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica* 2006;19:112-117.
24. Kilpatrick AM, Daszak P, Goodman SJ, Rogg H, Kramer LD, Cedenov V, et al. Predicting pathogen introduction: West Nile virus spread to Galapagos. *Conserv Biol* 2006;20:1224-1231.
25. Komar O, Robbins MB, Contreras GG, Benz BW, Klenk K, Blitvich BJ, et al. West Nile virus survey of birds and mosquitoes in the Dominican Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005;5:120-126.
26. Cruz L, Cardenas VM, Abarca M, Rodríguez T, Reyna RF, Serpas MV, et al. Short report: serologic evidence of West Nile virus activity in El Salvador. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:612-615.
27. Dupuis AP 2nd, Marra PP, Kramer LD. Serologic evidence of West Nile virus transmission, Jamaica, West Indies. *Emerg Infect Dis* 2003;9:860-863.
28. Asnis DS, Conetta R, Waldman G, Teixeira AA. The West Nile virus encephalitis outbreak in the United States (1999-2000): from Flushing, New York, to beyond its borders. *Ann NY Acad Sci* 2001;951:161-171.
29. Komar N. West Nile viral encephalitis. *Rev Sci Tech* 2000;19:166-176.
30. Komar N. West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res* 2003;61:185-234.
31. Garg S, Jampol LM. Systemic and intraocular manifestations of West Nile virus infection. *Surv Ophthalmol* 2005;50:3-13.
32. Garg S, Jampol LM, Wilson JF, Batlle IR, Buettner H. Ischemic and hemorrhagic retinal vasculitis associated with West Nile virus infection. *Retina* 2006;26:365-367.
33. Paddock CD, Nicholson WL, Bhatnagar J, Goldsmith CS, Greer PW, Hayes EB, et al. Fatal hemorrhagic fever caused by West Nile virus in the United States. *Clin Infect Dis* 2006;42:1527-1535.
34. Rappole JH, Hubálek Z. Migratory birds and West Nile Virus. *J Appl Microbiol* 2003;94:47s-58s.
35. Taylor RM, Hurlbut HS, Dressler HR, Spangler EW, Thrasher D. Isolation of West Nile virus from *Culex* mosquitoes. *J Egypt Med Assoc* 1953;36:199-208.
36. Yaremych SA, Warner RE, Van de Wyngaerde MT, Ringia AM, Lampman R, Novak RJ. West Nile virus detection in American crows. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1319-1321.
37. Yaremych SA, Warner RE, Mankin PC, Brawn JD, Raim A, Novak R. West Nile virus and high death rate in American crows. *Emerg Infect Dis* 2004;10:709-711.
38. Kulasekera VL, Kramer L, Nasci RS, Mostashari F, Cherry B, Trock SC, et al. West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001;7:722-725.
39. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile Virus. *Lancet Infect Dis* 2002;2:519-529.
40. Blitvich BJ, Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF, Marlenee NL, González-Rojas JI, Komar N, et al. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 853-856.
41. Farfán-Ale JA, Blitvich BJ, Loroño-Pino MA, Marlenee NL, Rosado-Paredes EP, García-Rejón JE, et al. Longitudinal studies of West Nile virus infection in avian, Yucatan State, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2004;4:3-14.
42. Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF, Blitvich BJ, González-Rojas JI, Cavazos-Alvarez A, Marlenee NL, et al. Serologic evidence of West Nile Virus infection in birds, Tamaulipas State, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2003;3:209-213.
43. Estrada-Franco JG, Navarro-López R, Beasley DW, Coffey L, Carrara AS, Travassos da RA, et al. West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1604-1607.
44. Elizondo-Quiroga D, Davis CT, Fernández-Salas I, Escobar-López R, Olmos DV, Gastalun LCS, et al. West Nile Virus Isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1449-1452.
45. Dominic T, McNamara T, Glaser A, Campbell R, Gubler D. A National Surveillance System for West Nile Virus in Zoological Institutions. 2001. Disponible en: [www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/ocf/ppt](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/ocf/ppt)
46. Taylor RM, Hurlbut HS. A study of the ecology of West Nile Virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 1956;5:579-620.
47. Carpenter S, La Casse W. Mosquitoes of North America. California: University of California, 1955.
48. Darsie R, Ward R. Identification and geographical distribution of the mosquitoes of North America, North of Mexico. Berkeley: Mosquito Systematics Supplement. *J Am Mosq Control Assoc* 1981;1:1-313.
49. Blitvich BJ, Marlenee NL, Hall RA, Calisher CH, Bowen RA, Roehrig JT, et al. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to west Nile virus in multiple avian species. *J Clin Microbiol* 2003;41:1041-1047.
50. Blitvich BJ, Bowen RA, Marlenee NL, Hall RA, Bunning ML, Beaty BJ. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for detection of West Nile virus antibodies in domestic mammals. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2676-2679.
51. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:4066-4071.
52. Centers for Disease Control and Prevention. West Nile virus 2006. Available at: [www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/index.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/index.html)
53. Health Canada. West Nile virus monitor 2006. Disponible en: [www.phac-aspc.gc.ca/wnv-vwn/index.html](http://www.phac-aspc.gc.ca/wnv-vwn/index.html)
54. Beasley DW, Davis CT, Estrada-Franco J, Navarro-López R, Campomanes-Cortes A, Tesh RB, et al. Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico. *Emerg Infect Dis* 2004;10:2221-2224.
55. Loroño MA, Blitvich BJ, Farfán-Ale JA, Puerto FI. Serologic evidence of West Nile Virus infection in horses Yucatán state, Mexico. *Rev Biomedica* 2003;14:159-161.
56. Farfán-Ale JA, Blitvich BJ, Marlenee NL, Loroño-Pino MA, Puerto-Manzano F, García-Rejón JE, et al. Antibodies to West Nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:908-914.
57. Ludwig GV, Calle PP, Mangiafico JA, Raphael BL, Danner DK, Hile JA, et al. An outbreak of West Nile virus in a New York City captive wildlife population. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67:67-75.
58. West Nile Virus activity- United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006;55:1204-1205.
59. West Nile Virus activity- United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006;55: 996.
60. Miller D, Manuel M, Baldwin C, Burtle G, Ingram D, Hines M, et al. West Nile Virus in farmed alligators. *Emerg Infect Dis* 2003;9:794-799.

61. Klenk K, Snow J, Morgan K, Bowen R, Stephens M, Foster F, et al. Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis* 2004;10:2150-2155.
62. Jacobson ER, Johnson AJ, Hernández JA, Tucker SJ, Dupuis AP 2nd., Stevens R, et al. Validation and use of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to West Nile virus in American Alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida. *J Wild Dis* 2005;41:107-114.
63. McIntosh BM, Jupp PG, Dickinson DB, Mc Gillivray GM, Sweetnam J. Ecological studies on Sindbis and West Nile viruses in South Africa. I. Viral activity as revealed by infection of mosquitoes and sentinel flocks. *S Afr J Med Sci* 1967;32(1):1-14.
64. Nir Y, Goldwasser R, Lasowski Y. Isolation of West Nile virus strains from mosquitoes in Israel. *Am J Epidemiol* 1968;87:496-501.
65. Hannoun C, Panther R, Mouchet J. Isolement en France du virus West Nile a partir de maladies et du vecteur *Culex modestus*. *Ficalbi. C.R. Acad. Sci. Paris*. 1964 ;259: 4170-4172.
66. Hayes CG, Burney MI. Arboviruses of public health importance in Pakistan. *J Pakistan Med Assoc* 1981;31:16-26.
67. Dandawate CN, Rajagopalan PK, Pavri KM. Virus isolation from mosquitoes collected in North Arcot district, Madras state, and Chittoor district, Andhra Pradesh, between November 1955 and October 1957. *Indian J Med Res* 1969;57:1420-1426.
68. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). West Nile Virus Mosquito Species. Available at: [www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/mosquitoSpecies.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/mosquitoSpecies.htm). [Accessed on: April 18, 2003].
69. Berthet Fx, Zeller HG, Drouet MT, Rauzier J, Digoutte JP, Deubel V. Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J Gen Virol* 1997;78:2293-2297.