

# Presencia del Virus del Nilo Occidental en Equinos (*Equus caballus*) de dos humedales de la Provincia de los Ríos, año 2007 al 2009

M.V.Z. Roberto Coello Peralta

## Presence of West Nile Virus in Horses (*Equus caballus*) in two wetlands in the province of the Ríos, 2007 to 2009

### Resumen

*Con el propósito de conocer la presencia del Virus del Nilo Occidental (VNO) en Equinos del Ecuador se investigó en: Las Abras de Mantequilla y Jauneche. Para la temática de esta investigación primero se realizó un censo de la población equina en las zonas a estudiar que fue de 273 animales. Luego se tomaron las muestras, para después ser procesadas en el Subproceso de Virología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” para la determinación de anticuerpos contra el VNO mediante la técnica de ELISA. Las muestras reactivas por ELISA fueron enviadas al CDC de Puerto Rico para ser confirmadas por la prueba de Neutralización por Reducción del Número de Placas (NTRP). De las 189 muestras analizadas, 15 resultaron reactivas por la técnica de ELISA de ellas 5 se confirmaron por NTRP.*

**Palabras clave:** Virus del Nilo Occidental, ELISA, NTRP

### Summary

*In order to know the presence of West Nile Virus (WNV) in horses of Ecuador. Was investigated in: The Abras de Mantequilla and Jauneche. For the theme of this research is first conducted a census of the equine population in the areas studied, which was 273 animals. Then the samples were taken, later to be processed on the thread of Virology, National Institute of Hygiene and Tropical Medicine “Leopoldo Izquieta Perez” for the determination of antibodies to WNV by ELISA. The reactive samples were sent to the CDC in Puerto Rico to be confirmed by neutralization test by reducing the number of plates (NTRP). Of the 189 samples tested, 15 were reactive by ELISA of which 5 were confirmed by (NTRP).*

**Key words:** West Nile Virus, ELISA, NTRP.

## Introducción

La Fiebre del Oeste del Nilo (FON) forma parte del grupo de enfermedades conocidas como arbovirosis y es causada por el Virus del Nilo Occidental perteneciente al complejo antigénico de la Encefalitis Japonesa, del género *Flavivirus* de la familia *Flaviridae* (1, 18, 25, 27). Ver Fig. 1

La enfermedad causada por el VNO es una zoonosis cuyo reservorio son las aves y su vector es un mosquito del género *Culex*; Sin embargo el hombre, el caballo y otros mamíferos como los lémures y los roedores también pueden ser infectados en forma indirecta o incidental, pues no forman parte del ciclo natural del virus (2, 25, 28). Ver Fig. 2.

Este virus estuvo ausente del hemisferio occidental hasta agosto de 1999 cuando se presentó una epidemia en la ciudad de Nueva York (3). En la actualidad, el VNO ha alcanzado proporciones epidémicas en todo el continente americano (3, 4, 5, 23, 24), y dadas sus condiciones ecológicas y los patrones migratorios de numerosas aves, este problema se ha diseminado en varios países en un lapso de tiempo muy breve. (1, 17). Ver. Fig. 3

El presente trabajo tiene una importancia trascendental, puesto que los equinos constituyen los animales centinelas u hospederos incidentales más susceptibles de la enfermedad, lo cual unido a la posibilidad latente del establecimiento de un ciclo de transmisión en el Ecuador podría llevar a esta enfermedad a convertirse en un grave problema de salud animal y pública. Por tal motivo la investigación del muestreo se desarrolló en los meses de septiembre a diciembre del 2007, puesto que en esos meses las aves migratorias se asientan en los dos humedales que se estudiaron. En el 2008 se realizó la prueba de ELISA; en el 2009 se confirmó y fue sustentada por el M.V.Z. Roberto Darwin Coello Peralta ante el tribunal asignado por el Instituto Tecnológico Agropecuario de Vinces, previo a la obtención al título Técnico Médico Veterinario Zootecnista.

Las condiciones climatológicas y ecológicas del territorio ecuatoriano, la presencia del vector y la identificación de la presencia del VNO en países cercanos como Colombia, hacen de vital importancia la investigación de este virus en Ecuador.

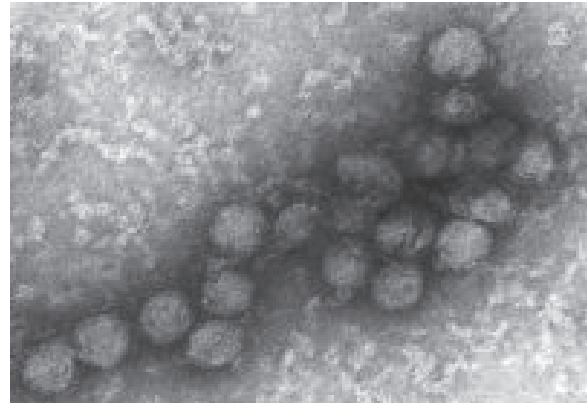


Figura 1. Virus del Nilo Occidental visto por Microscopía Electrónica.

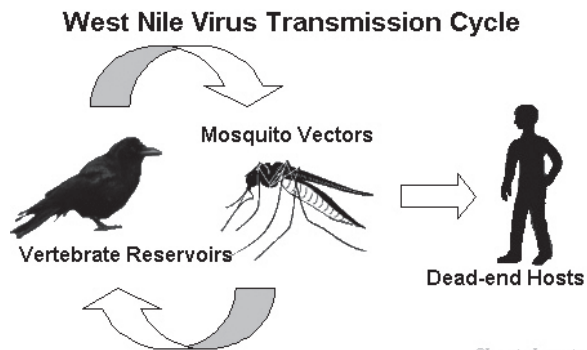


Figura 2. Ciclo de Transmisión del virus del Nilo occidental. ©Insecta-Inspecta



Figura 3. Presencia de Aves migratorias en el Humedal Abras de Mantequilla.



Figura 4. Animal sintomático con presencia del Virus del Nilo Occidental.

Número de equinos estudiados según recinto, sexo y edad, año 2007 al 2009.

Lugar	Machos	Hembras	Promedio de edades	Síntomas	Total de animales	%
El Recuerdo	2	9	3.4 años	Si	11	5.8
La Piedad	8	3	4.5 años	No	11	5.8
La Luz	17	13	6.5 años	No	30	15.9
Playones	4	7	7.1 años	No	11	5.8
Mapancillo	26	25	5.3 años	No	51	26.9
Jobo	7	11	4 años	No	18	9.6
Destierro	12	10	6 años	No	22	11.6
Jauneche	15	20	8.1 años	Si	35	18.5

Cuadro 1.

Fuente: elaboración propia

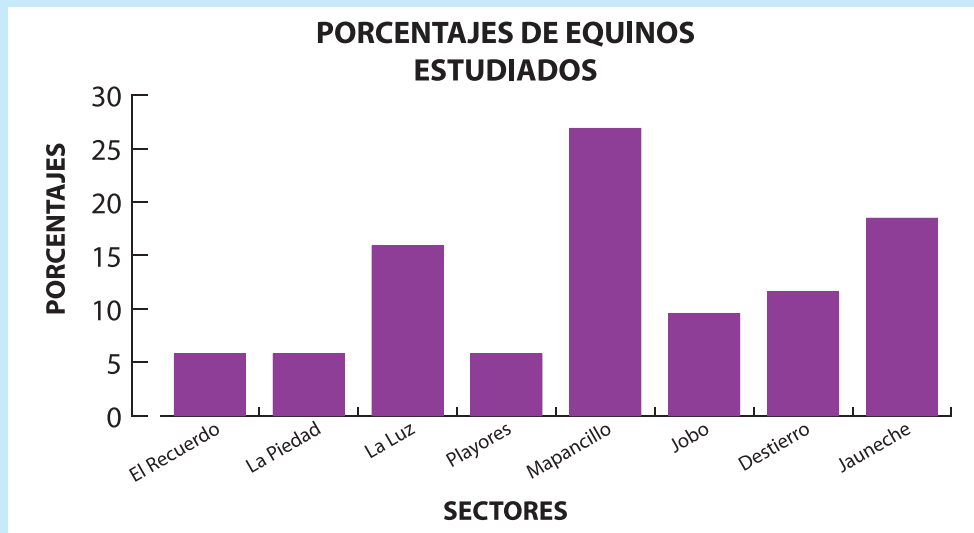


Gráfico 1. Porcentajes de equinos estudiados durante el estudio.

### Cuadro clínico

Al inicio de la enfermedad en humanos es súbito tras un período de incubación de 3 a 14 días y se caracteriza por un cuadro seudogripal con fiebre moderada o alta, odinofagia, cefalea, lumbalgia, artralgias, mialgias y cansancio o fatiga de aproximadamente una semana de duración. Suele acompañarse de inyección conjuntival, erupción cutánea, adenopatías, faringitis, dolor ocular, náuseas, vómitos y dolor abdominal (9, 10, 16, 20, 25). Habitualmente los síntomas son inespecíficos y de moderada intensidad (22, 23). En los casos graves el cuadro que predomina es la encefalitis y ocurre principalmente en personas mayores de cincuenta años. Se presenta con los síntomas inespecíficos junto con

rigidez de nuca, desorientación, debilidad muscular y coma (10, 16, 17, 20, 22). La mortalidad en los humanos asociada a la enfermedad varía del 3 a 15-30% especialmente en personas de edad avanzada (6,20).

La infección en los equinos suele ser asintomática, sin embargo hasta un 10% de los casos pueden presentar manifestaciones neurológicas de infección, como ataxia, paresia y parálisis de los miembros hasta llegar en algunos casos hasta la reclinación. En ocasiones pueden aparecer fasciculaciones de piel, temblores y rigidez muscular. En los últimos brotes en los Estados Unidos se observó la aparición de otros síntomas como disimetría, somnolencia, hiperestesia, hiperexcitabilidad e incluso conducta

agresiva. La tasa de mortalidad en los equinos es variable y ronda entre el 38% - 57,1%. (11, 12, 13, 15). Ver Fig. 4

## Materiales y Métodos

### 2.1 manejo del estudio

Se realizó un plan descriptivo en los humedales de Abras de Mantequilla y Jauneche de la Provincia de Los Ríos (7, 8). Se analizó un total de 189 muestras de suero provenientes de los humedales mencionados. De ellas, 180 eran de equinos y 9 muestras de humanos. Estas muestras fueron procesadas en el Subproceso de Virología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” (INHMT “LIP”). Ver cuadro 1 y gráfico 5.

### 2.2 Obtención de muestras

Previo a la obtención de la muestra de sangre se explicó a los propietarios de los caballos sobre los objetivos del estudio y luego se firmó un acta de consentimiento informado. Con el consentimiento del propietario se procedió a tomar la muestra de sangre, la misma que se realizó desde tempranas horas de la mañana cumpliendo las normas de bioseguridad indicadas para este tipo de trabajos puesto que se trata de una enfermedad zoonótica. Ver Fig. 5 y 6

### 2.3 Preparación y Análisis de muestras

Las muestras obtenidas fueron llevadas al INHMT “LIP” para la obtención del suero a utilizar y luego ser analizadas utilizando El kit diagnóstico de West Nile Virus IgM Capture ELISA de la casa Pan-Bio® (Ver Fig. 7). En el cual anticuerpos de tipo IgM de la muestra se combinan con anticuerpos anti-IgM unidos a pozos de poliestireno. Luego se coloca antígeno de VNO combinado con un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa al cual posteriormente se añade un sustrato cromógeno el cual produce un cambio de color en la reacción. Finalmente se para la reacción al colocar un ácido débil. El desarrollo de color en la reacción es indicativo de la presencia de anticuerpos IgM contra el VNO (26).

Se colocan 100 uL del suero diluido (1:100) en los pozos de la placa y se incuba a 37°C durante 1 hora. Al mismo tiempo se prepara una mezcla (a igual volumen) de anticuerpo monoclonal (Mab tracer) y antígeno de VNO. Luego se realizan 6 lavados con la solución de lavado del kit comercial. Se añaden 100 uL de la mezcla anticuerpo monoclonal-antígeno y se deja incubar por 1 hora a 37°C. Se lava 6 veces y posterior-



Figura 5. Toma de muestras en el sector de los Playones de las Abras de Mantequilla, año 2007 al 2009.



Figura 6. Bioseguridad: Colocacion de detán en el cuerpo del investigador, año 2007 al 2009.



Figura 7. Dilución de las muestras en el laboratorio, año 2007 al 2009.

mente se colocan 100 uL de solución TMB y se deja incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añaden 100 uL de solución stop para terminar la reacción. Se lee la prueba a 450 nm en un lector de ELISA.

### 2.4 Prueba confirmatoria

La detección de anticuerpos IgM contra VON en una muestra sanguínea se consideró como caso probable de infección según las recomendaciones para el diagnóstico de VON de la OMS (19, 21, 24). Por esta razón, todas las mues-

tras reactivas con el método de ELISA fueron enviadas al Laboratorio de la División de Enfermedades Infecciosas Transmitidas por Vectores del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Puerto Rico. (CDC por sus siglas en inglés) para que sean analizadas por la técnica de neutralización por reducción del número de placas (NTRP) con el objeto de confirmar los resultados obtenidos.

En esta técnica se utilizan diferentes diluciones del suero a estudiar junto con una dilución constante de virus. Se utilizan células BHK-21 en las cuales se colocan diluciones de los sueros a estudiar utilizando como diluyente medio celular HANK + suero fetal bovino al 2%; luego se coloca VNO que tenga un título viral de 15 - 20 UFP/50 uL, se homogeniza la mezcla virus-suero en una placa de 24 pozos y se dejan en incubación durante 4 horas a una temperatura de 37°C a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> junto con controles de virus, luego de lo cual se añade medio overlay para dejarlo en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por una semana. Finalmente se tiñen las células con Naftol Blue Black por 30 minutos y luego se lava el excedente. El cál-

culo del título de anticuerpos de la muestra se hace de la siguiente manera: Primeramente se calcula el promedio del número de placas en el pozo control de virus y luego se calcula el porcentaje de reducción de placas en los pozos con la mezcla virus/suero con respecto al promedio del pozo control de virus.

## 2.5 Materiales utilizados

**A) de campo:** Sogas, Vacutainer, Gradilla de plástico, Campana de extracción de sangre, Hieleras, Tijeras, Bolígrafos, Detán, Algodón, Alcohol, Cajas térmicas, Bandejas, Tablero con registro, etc

### B) de laboratorio:

ELISA de captura IgM (PanBio): Micro pocillos sensibilizados con anticuerpos anti IgM, Antígeno virus del Nilo Occidental (cepa NY99), Buffer de lavado, Diluyente de suero, Anticuerpo monoclonal conjugado con per oxidasa, Sustrato de tetrametilbencidina, Suero control positivo, Suero control negativo, Suero calibrador, Solución de parada (Stop).

Muestras reactivas para anticuerpos IgM anti-VNO por ELISA, año 2007 al 2009.

Código Laborat	Especie	Sexo	Edad (años)	Humedal	Recinto	Síntomas	Traslado a otras zonas	%
11 A	E. Caballus	Macho	8	A. Manteq	La Piedad	No	No	20
12 A	E. Caballus	Macho	7	A. Manteq	La Piedad	No	No	
14 A	E. Caballus	Macho	5	A. Manteq	La Piedad	No	No	
36 A	E. Caballus	Macho	2	A. Manteq	La luz	No	No	26.6
38 A	E. Caballus	Macho	5	A. Manteq	La luz	No	No	
44 A	E. Caballus	Hembra	3	A. Manteq	La luz	No	No	
B 10	E. Caballus	Hembra	4	A. Manteq	La luz	No	No	
52 A	E. Caballus	Macho	14	A. Manteq	Playones	No	No	6.7
64 A	E. Caballus	Macho	4	A. Manteq	Mapancillo	No	No	20
67 A	E. Caballus	Hembra	3	A. Manteq	Mapancillo	No	No	
85 A	E. Caballus	Hembra	15	A. Manteq	Mapancillo	No	No	
108 A	E. Caballus	Macho	3	A. Manteq	Jobo	No	No	6.7
8 J	E. Caballus	Macho	10	Jauneche	T. Baldíos	Si	Si	20
17 J	E. Caballus	Macho	1	Jauneche	Las Tablas	No	No	
26 J	E. Caballus	Macho	20	Jauneche	P. Central	No	No	

**Cuadro 2.**

**Fuente:** elaboración propia

Muestras confirmadas para anticuerpos IgM anti-VNO por ELISA, año 2007 al 2009.

Código de laboratorio	Especie	Sexo	E d a d (años)	Humedal	Recinto	Síntomas	Viajes a otras zonas
12	E. caballus	Macho	7	Abras de Mantequilla	La Piedad	Ninguno	No
14	E. caballus	Macho	5	Abras de Mantequilla	La Piedad	Ninguno	No
36	E. caballus	Macho	2	Abras de Mantequilla	La Luz	Ninguno	No
93	E. caballus	Macho	2	Abras de Mantequilla	Mapancillo	Ninguno	No
B10	E. caballus	Hembra	6	Abras de Mantequilla	La Luz	Ninguno	No

Cuadro 3.

Fuente: elaboración propia

Neutralización por reducción del número de placas (NTRP): células BHK - 21, placas microtiter, revestimiento de agarosa, medio celular nutritivo (HANK), suero fetal bovino, medio overlay, Naftol Blue Black, agua ultra pura, suero, virus sintético, incubadora de CO2 al 5%, pipetas, puntas de 1000 y 200 uL, frascos estériles.

## Resultados

De las 189 muestras analizadas, 15 resultaron reactivas (7,9%) y 20 indeterminadas (10.5%) para anticuerpos tipo IgM contra el VON por la técnica de ELISA. (Ver cuadro 2) Las muestras reactivas fueron testadas por NTRP para confirmar la presencia de los anticuerpos, encontrándose un total de 5 casos confirmados (Ver cuadro 3).

Se analizaron 9 muestras de humanos de las cuales 2 presentaron reactividad por la técnica de ELISA para anticuerpos contra VON (22,2%). Ninguna de ellas fue confirmada por NTRP.

## Discusión

En el presente trabajo se obtuvo la evidencia serológica de circulación de VNO en los humedales de Abras de Mantequilla y Jauneche en la Provincia de Los Ríos, constituyéndose en el primer reporte de la presencia del virus en el Ecuador. La zona estudiada es una de las rutas que siguen las aves en su migración durante la época fría en los países de Norteamérica, lo cual constituye un

factor de riesgo para la transmisión de diversos tipos de microorganismos en esa zona. Ver Fig. 3

Países como Argentina han reportado aislamiento de VNO en muestras de cerebro de equinos con síntomas de la enfermedad (14). Las muestras recolectadas para la ejecución de este trabajo provinieron de equinos que no presentaban signos ni síntomas de enfermedad, lo cual no permitió tomar muestras para intentar aislar el virus, lo cual hubiera permitido realizar estudios moleculares que indicarían el origen geográfico de la cepa viral que infectó a los equinos estudiados.

En países como Argentina, Cuba y Estados Unidos se ha reportado infección en humanos por este virus, sobre todo en los Estados Unidos en donde ha llegado a considerarse una enfermedad prevalente. En este estudio no se confirmó infección en personas, tal vez por el escaso número estudiado. Sin embargo, se observó reactividad en la prueba de ELISA contra VNO, lo cual puede haber ocurrido debido a la intensa reacción cruzada existente entre los diferentes tipos de flavivirus como el dengue, encefalitis de San Luis y otros arbovirus en general. Consideramos que debe estudiarse un mayor número de personas para esclarecer el grado de infección en humanos que el virus ha causado en las zonas analizadas.

Las aves constituyen el principal reservorio del virus. La complejidad en la metodología nece-

saría para realizar la captura de aves y el posterior procesamiento de las mismas, hizo que en este trabajo piloto no se realizara muestreo de este reservorio. Sin embargo en países como Colombia y Cuba (21) han demostrado presencia de anticuerpos contra el virus en diferentes tipos de aves. En futuros estudios es necesario tomar en cuenta este punto para clarificar y conocer los tipos de aves involucradas en la cadena de transmisión del VNO en el Ecuador.

Los anticuerpos IgM anti VNO encontrados en los equinos estudiados indican que la infección con el virus es reciente, puesto que estos anticuerpos pueden permanecer detectables en sangre por un tiempo de hasta 3 años después de la infección (2). Esto nos puede indicar que la entrada del virus al país se dio en estos últimos tres años. Deben ampliarse el estudio a otros humedales del país para confirmar o descartar esta hipótesis.

Este trabajo constituye un estudio piloto el cual permitió obtener la evidencia serológica de la presencia de un nuevo virus en el Ecuador. Para conocer mejor la epidemiología, su ciclo de transmisión y las especies involucradas en el mismo debe realizarse estudios más grandes no sólo en los humedales de la Provincia de Los Ríos sino en otras regiones del país. De igual forma, el análisis de muestras humanas es necesario para esclarecer el grado de diseminación en humanos del VNO.

Los resultados de este trabajo constituyen un primer paso en el estudio del VNO en el Ecuador.

Las investigaciones derivadas del mismo permitirán conocer mejor al virus y su interacción con nuestro ecosistema y población, permitiendo a las autoridades de salud fortalecer los sistemas de vigilancia epidemiológica para beneficio de toda la sociedad ecuatoriana.

## Conclusiones

1. Se obtuvo evidencia serológica de presencia de Virus del Nilo Occidental en equinos de los Humedales de Abras de Mantequilla y Jauneche en la Provincia de Los Ríos.
2. No se encontraron anticuerpos para este virus en las personas estudiadas, además fue un equipo para extraer muestras en personas de dicho sectores.

## Recomendaciones

1. Realizar estudios más amplios en estos humedales y en otras zonas del país que sean ruta de las aves migratorias.
2. Realizar estudios en los cuales se investiguen las aves y los mosquitos vectores de esta enfermedad emergente tropical.
3. Alertar a las autoridades de salud los hallazgos de este trabajo con el fin de implementar un sistema de vigilancia epidemiológica.
4. Difundir los resultados obtenidos a la comunidad médica, científica y la sociedad en general.
5. Hacer periódicamente vigilancia epidemiológica en caballos y perros (animales centinelas) y humanos para establecer la circulación de este virus.

## Bibliografía

1. Barriga G, Arumir C, Mercado F. (2002): Actualidades sobre la fiebre del Nilo Occidental. *Rev Mex Patol Clin* 49 (4): pp 203 - 211. México
2. Burke D, Monath T. (2001): Flaviviruses. En: Knippe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins; pp. 1043 - 1125. EEUU.
3. Centers for Disease Control and Prevention. (1999): Outbreak of West Nile like viral encephalitis New York. *Morb Mortal Wkly Rep*; 48: pp. 845 - 849. EEUU.
4. Campbell G, Marfin A, Lanciotti R, Gubler D. (2002): West Nile Virus. *Lancet Infect Dis*; 2: pp 519 - 529. EEUU
5. Harrison T. (2002): West Nile Encephalitis. *J Pediatr Health Care*; 16: pp. 278 - 281. EEUU.
6. Izaguirre R, López L, Richard J, Mesa J, Herrera O. (2003): Infección por Virus del Nilo Occidental. *Revista de Especialidad Médico-Quirúrgicas*; 8 (2): pp. 5 - 7. México.
7. Javier CASTILLO-OLIVARES\*, James WOOD. (2004): West Nile virus infection of horses. *Vet. Res.* 35; pp. 467-483. EEUU.
8. Morales M, Barranteguy M, Fabbri C, García J, Vissani A, Trono K, et al. (2006). West Nile Virus isolation from equines in Argentina *Emerging infectious diseases*; 12 (10): dispatch.

9. Mattar S, Edwards E, Laguado J, Gonzalez M, Alvarez J, Komar N. (2005): West Nile Virus in Colombian horses. *Emerging infectious diseases*; 11 (9): pp. 1497 - 1498. Colombia.
10. Mandel G, Bennet J, Dolin R (2000): *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, EEUU.
11. Marfin A, Gubler D. (2001): West Nile Encephalitis: an emerging disease in the United States. *CID*; 33: pp. 1713 - 1719.
12. OPS/OMS/CDC. (2006): *Taller sobre Vigilancia y Diagnóstico del Virus del Nilo Occidental*. Pergamino, pp. 50. Argentina
13. Petersen L, Marfin A. (2002): West Nile Virus: a primer for the clinician. *Ann Intern Med* 2002; 137: pp. 173 - 179. EEUU.
14. Soler D, Vera J. (2007): *Intento de Detección del Virus del Oeste del Nilo en aves silvestres de San Andrés Isla, Colombia*. Universidad Nacional de Colombia - Asociación de Veterinarios de Vida Silvestre. Colombia.
15. Sampson B, Ambrosi C, Charlot A, Reiber K, Veress J, Anmbrustmacher V. (2000): The pathology of human West Nile Virus infection. *Hum Pathol*; 31: pp. 527 - 531. EEUU
16. Valles X, Sánchez F. West Nile virus: el virus de la fiebre del Oeste del Nilo. *Enf. Emerg.* 2000; 2 (4): 232 - 238. España.
17. West Nile Virus IgM Capture ELISA. PanBio. EEUU.



◀ **M.V.Z. Roberto Coello Peralta**

Egresado de la Maestría en Microbiología con mención Biomédica.

Tel: 088428659 - 052790274.

E-mail: rdcoello@hotmail.com

**Dr. Carlos Mosquera Martínez.**

Jefe del Departamento de Microbiología del INH Y MT "LIP".

Docente de la Facultad de Ciencias Médicas. Jefe de Cátedra de Virología.

Tel: 099955239

E-mail: carlosmosquera.lv@gmail.com

**Dr. Manuel González González.**

Jefe del Departamento de Investigación y Docencia del INH Y MT "LIP".

Docente de la Universidad Católica de Guayaquil.

Tel: 097426055

E-mail: manuel\_gonzalezg@yahoo.com