



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**Estudio serológico y molecular del virus del oeste del Nilo en sujetos
del noreste de México**

T E S I S
QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
EN
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

P r e s e n t a

M. en C. María de Lourdes Garza Rodríguez

México, D.F. 2009



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Medicina de Conservación del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional y en el laboratorio de Infectología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Reyes López y La Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla.

Agradecemos a CONACYT por los apoyos financieros de los proyectos FOMIX NL-2003-CO4-12553 (otorgado a la Dra. Ana María Rivas-Estilla) y por el proyecto 48497 (otorgado al Dr. Miguel Ángel Reyes López). Gracias por los apoyos financieros otorgados por la Universidad Autónoma de Nuevo León (PAICyT SA1429-06) y la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (registro 20060351 y 20070405). Agradecemos también el apoyo del Instituto Nacional de Salud de los EUA otorgado al Dr. Brad Blitvich (registro 5R21AI067281). Agradezco por las becas otorgadas por CONACYT, PIFI-IPN y Universia Santander, durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

DEDICATORIA

**A Marco, Sofía, Fernanda y Gaby
por que son el motor que me impulsa
a luchar por ser cada día mejor.**

AGRADECIMIENTOS

A mi director interno, el Dr. Miguel Ángel Reyes sus enseñanzas, le agradezco su confianza y apoyo durante el transcurso de mi tesis. Gracias por estar siempre pendiente de mi trabajo y por sus palabras.

A mi directora externa, la Dra. Ana María Rivas por su paciencia, por tener siempre tiempo para revisar los avances de la tesis, por enseñarme a escribir un artículo científico y por compartir conmigo su entusiasmo por la investigación y sus conocimientos. Le agradezco todo el tiempo que me brindó a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Herminia Martínez por que su apoyo fue pieza fundamental para que este proyecto se hiciera realidad.

Al Dr. Javier Ramos por todas sus enseñanzas, gracias por compartir conmigo su experiencia y por el apoyo en la asesoría de la parte clínica de mi tesis.

Gracias a mi consejero, el Dr. Rogelio Maldonado, por estar siempre presente en mis presentaciones y por el apoyo que tan amablemente me brindó durante mi tesis.

A Emma Reyes por estar siempre pendiente de nuestro trabajo, por su amabilidad y por que siempre se dio el tiempo de contestar mis correos.

A Marco por su apoyo, por sus palabras, por revisar el escrito de mi tesis, por sus consejos, su cariño y por estar siempre dispuesto a ayudarme.

A Celia por su amistad, por compartir estos años juntas y por el apoyo que tantas veces me dio durante mi trabajo de tesis.

A Karina por su apoyo en el análisis estadístico, por sus enseñanzas, sus palabras y por ser una gran amiga.

A Juany por su amistad, paciencia y por que siempre me da ánimos para seguir trabajando.

A Norma y Lupita por ser las mejores compañeras de trabajo, por su apoyo y amistad gracias.

A Diana, Dianita, Iram, Miguel Ángel, Mario y Damaris gracias por hacer divertidos los momentos de trabajo, por sus palabras y su amistad.

A mis padres, por enseñarme a estudiar y a tener amor por el trabajo.

Gracias a las dos abuelitas de mis niñas (Lourdes y Socorro) por cuidar de ellas tantas veces en las que estuve ausente, gracias por darles el cariño y los cuidados que en esos momentos no pude darles.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Antecedentes	1
I.2 Epidemiología molecular	3
I.3 Transmisión y ciclo replicación	6
I.4 Filogenia	9
I.5 Estructura del genoma	11
I.6 Proteínas virales no estructurales	11
I.7 Morfología y composición del virión	12
I.8 Ciclo de replicación del VON	13
I.9 Proteínas del huésped y resistencia a la infección	14
I.10 Cuadro clínico	15
I.10.1 Meningitis por VON	16
I.10.2 Encefalitis por VON:	16
I.10.3 Parálisis Flácida Aguda	17
I.10.4 Fiebre Hemorrágica por VON	18
I.11 Descripción clínica de casos de infección por arbovirus según los de los EUA.	18

I.12 Factores de riesgo del huésped	19
I.13 Diagnóstico	20
I.13.1 Pruebas Serológicas	20
I.13.1.1 Pruebas de Neutralización de Reducción de Placa (PNRP)	20
I.13.1.2 Pruebas de Ensayo Inmunoabsorbente ligado a Enzimas (ELISA)	21
I.13.1.3 Otras pruebas serológicas	23
I.13.2 Pruebas de detección del genoma viral	23
I.13.2.1 Pruebas de PCR en tiempo real y RT-PCR	24
I.13.2.2 Pruebas de detección de antígenos	25
I.14 Tratamiento	26
I.15 Medidas de Prevención y control	27
I.16 Diseminación del VON en America	28
I.17 Actividad del VON en México	33
II. JUSTIFICACIÓN	36
III. HIPÓTESIS	38
IV OBJETIVOS	39
V MATERIAL Y MÉTODOS	40
V.1 Origen de los reactivos, material y equipo de laboratorio	40
V.1.1 Reactivos	40
V.1.1.1 Pruebas serológicas	40
V.1.1.2 Pruebas De detección del genoma viral	41
V.1.2 Material Biológico	41

V.1.3 Equipo	42
V.1.3.1 Separación de Muestras	42
V.1.3.2 Pruebas Serológicas	42
V.1.3.3. Pruebas de detección del genoma viral	42
V.1.4 Programas de análisis computacional	43
V.2 Métodos	43
V.2.1 Recolección de muestras biológicas	43
V.2.2 Sujetos de estudio	44
V.2.3. Criterios de inclusión y exclusión	44
V.2.4 Pruebas serológicas	46
V.2.4.1 Detección de anticuerpos de tipo IgM	
anti VON por ELISA	46
V.2.4.2 Detección de anticuerpos de tipo IgG	
anti- VON por ELISA	48
V.2.4.3 Detección de anticuerpos de tipo IgM	
anti- VD por ELISA	49
V.2.4.4 Detección de anticuerpos de tipo IgG	
anti- VD por ELISA	51
V.2.4.5 Pruebas de PNRP	52
V.2.5 Pruebas de detección del genoma del VON	53
V.2.5.1 Extracción de RNA total	53
V.2.5.2 Diseño de oligonucleótidos y sondas Taq Man	54
V.2.5.3 Reacción de amplificación por medio de qPCR	55

V.2.5.4	Ensayos de especificidad para la qPCR	57
V.2.5.5	Ensayos de sensibilidad para qPCR	57
V.2.5.5.1	Clonación y análisis de los PA	57
V.2.5.5.2	Análisis de clonas recombinantes	59
V.2.5.5.3	Determinación de las secuencias nucleotídicas	59
V.2.5.5.4	Análisis de las secuencias nucleotídicas	60
V.2.5.5.5	Determinación de los límites de sensibilidad de los ensayos de qPCR	60
V.2.5.6	Ensayos de RT-PCR cualitativa	61
V.2.5.6.1	Reacción de RT.	61
V.2.5.6.2	Reacción de PCR anidada (PCRn)	61
V.3	Análisis estadístico	64
VI.	RESULTADOS	65
VI.1	Sujetos de estudio	65
VI.2	Pruebas serológicas	65
VI.2.1	Detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG anti- VON por ELISA	65
VI.2.2	Detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG anti- VD por ELISA	66
VI.2.3	Detección de anticuerpos neutralizantes por medio de PNRP	67
VI.2.4	Análisis estadístico	69
VI.3	Pruebas de detección del genoma del VON	74

VI.3.1 Reacción de amplificación por medio de qPCR	74
VI.3.2 Reacción de amplificación por medio de RT-PCR anidado	79
VII. DISCUSIÓN	81
VIII. CONCLUSIONES	87
IX. PERSPECTIVAS	89
X. BIBLIOGRAFÍA	90
XI. ANEXOS	98
Anexo 1: Hoja de Recolección de Datos	98
Anexo 2: Carta de Consentimiento	99
Anexo 3: Fundamentos de las pruebas serológicas de ELISA	101
Anexo 4: Análisis de secuencias nucleotídicas	104
Anexo 5: Purificación de productos Amplificados	107
Anexo 6: Protocolo de purificación de DNA plasmídico	109
Anexo 7: Análisis de las secuencias nucleotídicas	111
Anexo 8: Resultados de las pruebas serológicas de PNRP	117
Anexo 9: Resultados de los ensayos de sensibilidad para PCR en tiempo real	121
Anexo 10: Productividad Científica	123
Anexo 11: Artículo publicado en revista internacional indexado	130

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de Mosquitos positivas para el VON en los EUA	8
Tabla 2. Especies de virus incluidos en el género flavivirus de la familia flaviviridae	10
Tabla 3. Casos de infección por el VON de 1999 hasta el 8 de Enero de 2009 en EUA	31
Tabla 4: Interpretación de resultados para la detección de anticuerpos de tipo IgM anti- VON por medio la prueba de ELISA	48
Tabla 5: Interpretación de resultados para la detección de anticuerpos de tipo IgG anti- VON por medio la prueba de ELISA	49
Tabla 6. Interpretación de resultados para la detección de anticuerpos de tipo IgM anti- VD por medio la prueba de ELISA	51
Tabla 7. Oligonucleótidos y sondas utilizadas en las reacciones de qPCR	56
Tabla 8. Reacción de qPCR para amplificar las regiones 3'UTR y la proteína E del VON	56
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones 3'UTR y proteína E del genoma del VON	57
Tabla 10. Reacción de PCR para secuenciación de las regiones 3'UTR y proteína E del genoma del VON	59
Tabla 11. Condiciones de reacción utilizadas para la síntesis del DNAC a partir de RNA viral	61
Tabla 12. Secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos utilizados en la PCRn	62
Tabla 13. Condiciones de reacción de la PCRn	63

Tabla 14. Características clínicas y demográficas de los sujetos de estudio	65
Tabla 15. Detección de anticuerpos del tipo IgG e IgM anti VON y anti VD en los grupos estudiados	67
Tabla 16. Resumen de los resultados de las pruebas de PNRP	68
Tabla 17. Características de los participantes del estudio seropositivos para el VON por medio de las pruebas de PNRP	69
Tabla 18: Comparación de lo sujetos IgG-VON e IgG-VD positivos y el género	70
Tabla 19: Comparación de lo sujetos IgG-VON e IgG-VD positivos y el intrevalo de edad	71
Tabla 20: Comparación de lo sujetos IgG-VON e IgG-VD positivos contra la procedencia	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las epidemias y epizooticas del VON en Europa y el Mediterráneo desde 1994 al 2004	2
Figura 2. Árbol filogenético del VON basado en la secuencia de la proteína estructural E.	5
Figura 3. Esquema del ciclo de transmisión del VON.	7
Figura 4. Morfología y composición del VON	11
Figura 5. Estructura del VON según una reconstrucción por microscopía crio-electrónica	13
Figura 6. Ciclo de replicación del Virus del Oeste del Nilo	14
Figura 7. Viremia y respuesta inmune frente a las infecciones por el VON	26
Figura 8. Movimiento secuencial del VON en los EUA por año, según los datos reportados por los CDC	29
Figura 9. Incidencia del VON en EUA de 1999 al 2008	29
Figura 10. Actividad del VON en EUA en el 2007	30
Figura 11. Donadores de sangre virémicos detectados en el 2007 en los EUA	31
Figura 12. Rutas de aves migratorias del continente americano	32
Figura 13. Actividad del VON en México	35
Figura 14. Diagrama de flujo	40
Figura 15. Estructura del genoma del VON	55
Figura 16: Comparación de lo sujetos IgG-VON e IgG-VD positivos y el género	70
Figura 17. Resultados del análisis de comparación entre intervalos de edades y la exposición a flavivirus	71

Figura 18. Comparación de sujetos con exposición a flavivirus contra la procedencia.	74
Figura 19. Electroferograma de los productos amplificados obtenidos de la regiones de la proteína E y la región 3'UTR por medio de PCRn	75
Figura 20. Electroferograma de productos de las regiones de la proteína E y 3' UTR	76
Figura 21. Amplificación de la región 3'UTR del genoma del VON por medio de PCR en tiempo real	76
Figura 22. Amplificación de la región de la proteína E del genoma del VON por medio de PCR en tiempo real	77
Figura 23. Grafica de los valores de CT con respecto al logaritmo del número de copias de la reacción que amplifica la región 3'UTR del genoma del VON	77
Figura 24. Grafica de los valores de CT con respecto al logaritmo del número de copias de la reacción que amplifica una región de la proteína E del genoma del VON	78
Figura 25. Resultados obtenidos para las muestras de suero y LCR de los pacientes neurológicos para la región de la proteína E del VON	79
Figura 26. Electroferograma de productos de la región de la proteína C y Pre M del genoma del VON	80

ABREVIATURAS

CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de EUA
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotrietol
DV	Donadores Virémicos
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente ligado a Enzimas
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
m	eliminar
μM	eliminar
PCR	eliminar
PCRn	Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada
PNRP	Pruebas de Neutralización de Reducción de Placa
qPCR	PCR Cualitativa en Tiempo Real
RM	Razón de Momios
RT	retrotranscripción
s	eliminar
VD	Virus del Dengue
VESL	Virus de la Encefalitis de St Louis
VON	Virus del oeste del Nilo

RESUMEN

Existe evidencia de la presencia del Virus del oeste del Nilo (VON) en aves, cocodrilos, mosquitos y humanos en México. Los escasos reportes de humanos infectados por el VON en México son difíciles de explicar debido a que en EUA se han reportado una gran cantidad de casos en humanos y a que existe evidencia de que en México el VON se encuentra ampliamente distribuido en animales. El objetivo de este estudio fue el de evaluar la presencia del VON en humanos del Noreste de México empleando métodos serológicos y moleculares. Se analizaron muestras de suero y líquido cefalorraquídeo para identificar anticuerpos de los tipos IgG e IgM anti-VON y anti-Virus del Dengue (VD) por medio de ELISA. Se realizaron pruebas de PNRP para la detección de anticuerpos neutralizantes. También se realizaron pruebas de RT-PCR anidado y PCR en tiempo real para identificar el genoma del VON. Se incluyeron un total de 1,432 sujetos (588 pacientes con enfermedad febril, 44 pacientes con encefalitis y 800 donadores de sangre). Todos los sujetos analizados fueron negativos para la detección del genoma viral por medio de las pruebas moleculares. No se detectó ningún sujeto positivo para anticuerpos del tipo IgM anti-VON. Se analizaron 425 muestras para la detección de anticuerpos del tipo IgG anti-VON y la prevalencia de anticuerpos IgG-VON en pacientes febriles, pacientes con encefalitis y donadores de sangre fue de 51%, 33% y 50% respectivamente. Se analizaron 147 muestras positivas para anticuerpos IgG anti-VON por medio de la prueba de PNRP y se identificaron 6 sujetos positivos para anticuerpos neutralizantes anti-VON, los cuales no tenían historia de haber viajado en los últimos 12 meses. Se identificaron 65 sujetos con anticuerpos neutralizantes contra el VD y 24 fueron positivos para el VD serotipo 2. Este trabajo permitió esclarecer algunas de la hipótesis para explicar el comportamiento del VON en nuestro país. La alta incidencia de anticuerpos contra el VD en la población estudiada nos permite sugerir que en el noreste del país la infección por el VON es menos severa que en otras poblaciones debido a que los anticuerpos del VD limitan la infección con el VON en esta región.

ABSTRACT

Several reports demonstrated evidence of West Nile Virus (WNV) infection in birds, crocodiles, mosquitoes and a human case in México. The fact that there are few human WNV cases reported in Mexico is difficult to explain because of the large number of human cases reported in the United States and the available evidence that WNV is widely distributed in animals in Mexico. The aim of this study was to evaluate using serologic and molecular approaches the presence of WNV in northeast Mexico in different groups of patients and healthy subjects.

Serum and cerebrospinal liquid samples were analyzed to identify Anti-WNV IgM Abs, Anti-WNV IgG Abs, Anti-DENV IgM Abs and Anti-DENV IgG Abs by ELISA. We also performed real time RT-PCR to detect WNV genome and the detection of neutralizing antibodies by PRNT.

The study cohort consisted of 1432 individuals (588 febrile patients, 44 encephalitic patients and 800 asymptomatic blood donors). All subjects were negative for WNV IgM and real time PCR. Sixty subjects were reactive for dengue virus (DENV) IgM (16 blood donors and 44 febrile patients). A subset (n = 425) of individuals was also screened by ELISA for flavivirus IgG. The prevalence of flavivirus IgG in febrile patients, encephalitic patients and blood donors ranged from 33-51%. A subset (n = 147) of sera reactive for flavivirus IgG was further tested by plaque reduction neutralization test. Six individuals with no history of travel during the preceding 12 months were seropositive for WNV. Another 65 individuals were seropositive for DENV1 and 24 were seropositive for DENV2. This work provides important evidence to clarify some of the hypotheses to explain the behavior of WNV in our country. The high incidence of DENV antibodies in the studied groups allowed us to suggest that WNV infection in northeast Mexico is less severe than in other populations because DENV antibodies limit WNV infection in this region.

ESTUDIO SEROLÓGICO Y MOLECULAR DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN SUJETOS DEL NORESTE DE MÉXICO

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

El Virus del Oeste del Nilo (VON) fue aislado por primera vez en 1937 en la sangre de una mujer con enfermedad febril en el Oeste del Nilo, en una provincia al Norte de Uganda (Smithburn, 1940; Hayes, 2001). En esa época se identificó que el virus se transmitía de aves a humanos por medio de vectores y se clasificó como un virus transmitido por vectores o arbovirus (Solomon et al, 2003). Aunque en ese tiempo el VON no se asoció con enfermedad neurológica, se identificó que el virus estaba relacionado antigénicamente con otros virus neurotrópicos como el virus de la Encefalitis Japonesa y el virus de la encefalitis de St Louis (VESL) (Hayes, 2001). Los primeros brotes de enfermedad febril (Fiebre del virus del oeste del Nilo) se presentaron en África, Medio Oriente y Asia. Los primeros casos de meningoencefalitis en humanos, adquirida de manera natural, se reportaron en Israel en 1957 (Hayes, 2001).

A lo largo de la historia se han presentado casos esporádicos y brotes del VON en África, Medio Oriente, Europa y Asia (Figura 1) (Jupp y McIntosh, 1967; McIntosh et al, 1969; Hayes, 2001). Durante la década de 1960 a 1970 se reportaron casos de meningoencefalitis en equinos en Egipto y Francia (Zak et al, 2005), además de casos en humanos en el Norte de Francia. Hasta antes de 1996 las infecciones por el VON eran consideradas como enfermedades menores de humanos y equinos, que se presentaban en brotes esporádicos y que no representaban un problema de salud pública (Dauphin et al, 2004; Dauphin y Zientara, 2007). Desde los años 90's la epidemiología del VON parece haber cambiado, con un incremento en la frecuencia y severidad de los brotes, incluyendo la enfermedad en áreas urbanas (Gubler, 2007).

En Israel, en 1998, se reportaron 18 casos de encefalitis en caballos infectados por el VON. Además el virus fue aislado de cerebros de aves y la secuencia fue analizada. En 1999 el VON fue aislado en biopsias de cerebro de dos pacientes que fallecieron a causa de la infección en Israel, la secuencia nucleotídica analizada fue casi idéntica a cepas analizadas en aves en 1998 (Weinberger et al, 2001; Dauphin et al, 2004).

En 1999 se reportó el primer brote de encefalitis por VON en humanos en América. Los primeros casos en humanos se reportaron en la ciudad de Nueva York y coincidieron con brotes en cuervos y aves exóticas (Solomon et al, 2003; Hayes et al, 2005a; Gubler, 2007).

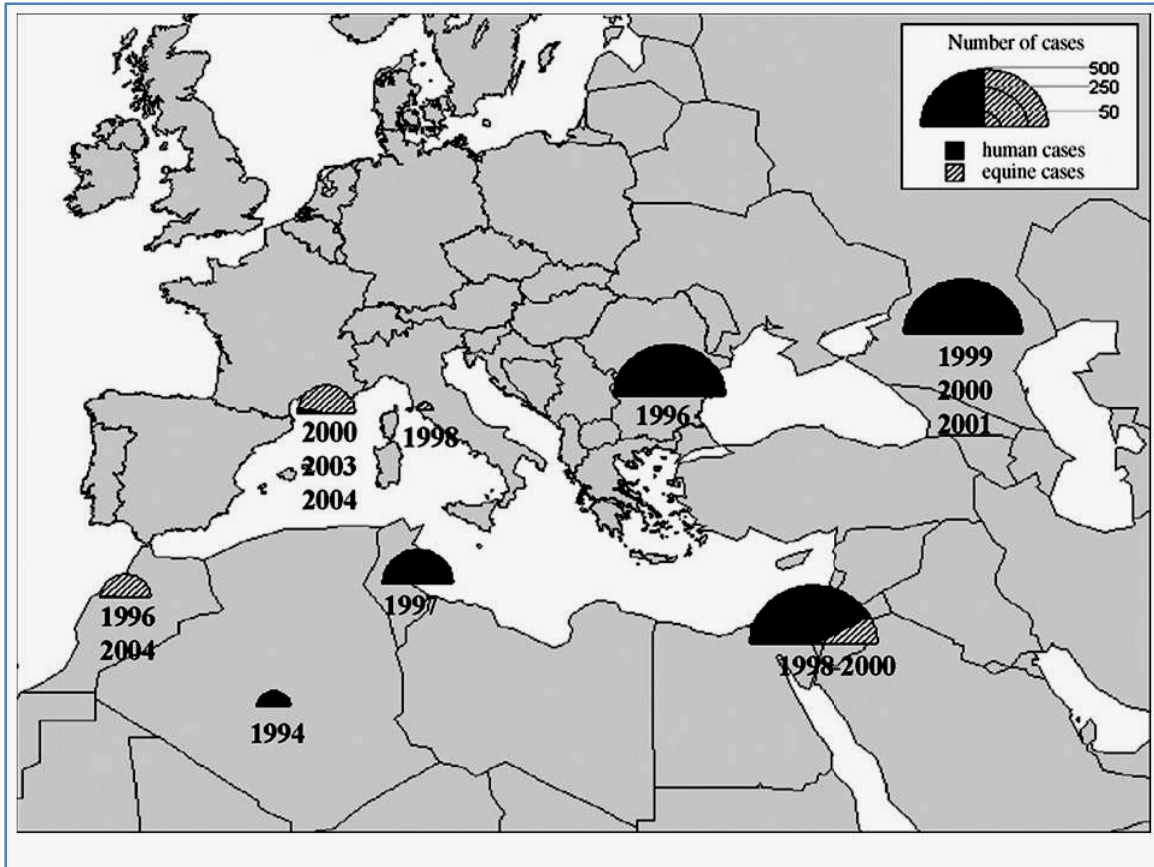


Figura 1. Distribución de las epidemias y epizootias del VON en Europa y el Mediterráneo desde 1994 al 2004. Se muestran los brotes del VON en humanos y equinos. El tamaño de los semicírculos indica el número de casos aproximados que se registró en los brotes.

En Rusia, en 1999, se presentó un brote de encefalitis severa en la ciudad de Volgograd. Se analizaron 318 muestras de pacientes, de las cuales 183 (58%) fueron confirmadas por el laboratorio como infecciones por VON. El cuadro clínico que presentó la mayoría de los pacientes fue severo y 40 de ellos fallecieron a causa de la infección (Dauphin et al, 2004).

En Israel se presentó un nuevo brote en agosto del año 2000 en donde se confirmaron 417 casos de infección en humanos y 33 de ellos fallecieron a causa de la infección. La secuenciación y el análisis filogenético reveló la co-circulación de dos variantes genéticas del virus, una de ellas estaba estrechamente relacionada con la cepa aislada en Israel en 1998 y con la cepa de Nueva York aislada en

1999. La otra cepa se relacionó con la cepa aislada en Rusia en 1999 (Weinberger et al, 2001; Dauphin et al, 2004).

La llegada del VON al continente Americano en 1999 marcó la introducción de un virus del viejo mundo al Nuevo Mundo, la primera en la historia reciente. En los siguientes 9 años el virus ha presentado brotes anuales y se ha esparcido a lo largo de Estados Unidos (EU) y Canadá, así como el Caribe y Latino América (Hayes et al, 2005b) (Dauphin et al, 2004; Hayes et al, 2005a). En México existen reportes de aves, mamíferos y mosquitos infectados por el VON. El impacto en la salud humana de esta infección emergente en nuestro país aún se desconoce debido a los escasos estudios que existen para identificar el virus en humanos.

I.2 Epidemiología molecular

Los análisis filogenéticos globales de las cepas del VON han evidencian la existencia 2 linajes (1 y 2) que divergen en un 30% en su secuencia nucleotídica (Dauphin y Zientara, 2007). Las cepas del linaje 1 se encuentran en África, Europa, Medio Oriente, India y América y se relacionan comúnmente con brotes de enfermedad humana y equina. Las cepas del linaje 2 se encuentran en África Sub Sahara y Madagascar y se han relacionado solo con infecciones enzoóticas, hasta la fecha no se ha identificado ninguna infección en humanos ocasionada por las cepas del linaje II del VON (Brinton, 2002; Dauphin et al, 2004). Aún se desconocen las razones por las cuales las cepas del linaje 2 solo han sido aisladas en África y Madagascar. (Dauphin et al, 2004).

Los datos epidemiológicos y clínicos sugieren que un virus con mayor capacidad de virulencia y potencial epidémico surgió en las epidemias de los años 90s. Este virus posee características que le han permitido incrementar las cargas virales en los huéspedes susceptibles y así tener ventajas para diseminarse en el Mediterráneo, Europa y el continente Americano (Gubler, 2007). El análisis de los genomas virales aislados en las epidemias y epizooticas recientes muestra que las secuencias nucleotídicas son muy similares (más del 98% de homología), lo que indica que todos los virus pertenecen a un mismo grupo (clade) y poseen un ancestro común (Gubler, 2007)(Figura 2).

La primer cepa del VON secuenciada en EUA fue la cepa NY99, la cual fue aislada a partir de muestras biológicas de un flamingo del zoológico del Bronx. Los análisis filogenéticos de la secuencia del virus indican que el virus que ingresó a Nueva York provenía del Medio Oriente, muy probablemente de Israel (Lanciotti et al, 1999; Giladi et al, 2001; Beasley, 2005)(Figura 2). El análisis de las cepas aisladas en la costa este de los EUA en el 2000 reveló que las secuencias eran casi idénticas a la cepa NY99. Después, en el 2001 se encontró que una variante genética había sustituido a

la cepa NY99, a la nueva variante se le llamó cepa “Norte América”. La cepa Norte América difiere en un 0.18% en su secuencia nucleotídica de la cepa NY99 y posee características nucleotídicas y aminoacídicas específicas (Granwehr et al, 2004). Otra de las variantes genéticas identificadas es la cepa de la costa del sureste de Texas que difiere en un 0.27% de la cepa NY99 y un 0.55% de la cepa Norte América (Davis et al, 2005; Davis et al, 2007; Snapinn et al, 2007). La variante Mexicana encontrada en un cuervo en el 2002 difiere en un 0.45% con respecto a la cepa NY99 (Granwehr et al, 2004). El promedio de divergencia que la cepa mantiene es de 0.22% con respecto a la cepa NY99 (Estrada-Franco et al, 2003). Hasta la fecha no se tiene evidencia de cambios fenotípicos entre las cepas aisladas en Norte América. Finalmente, aún se desconoce si la evolución adaptativa que está teniendo el virus en el continente americano ha generado cepas más o menos virulentas.

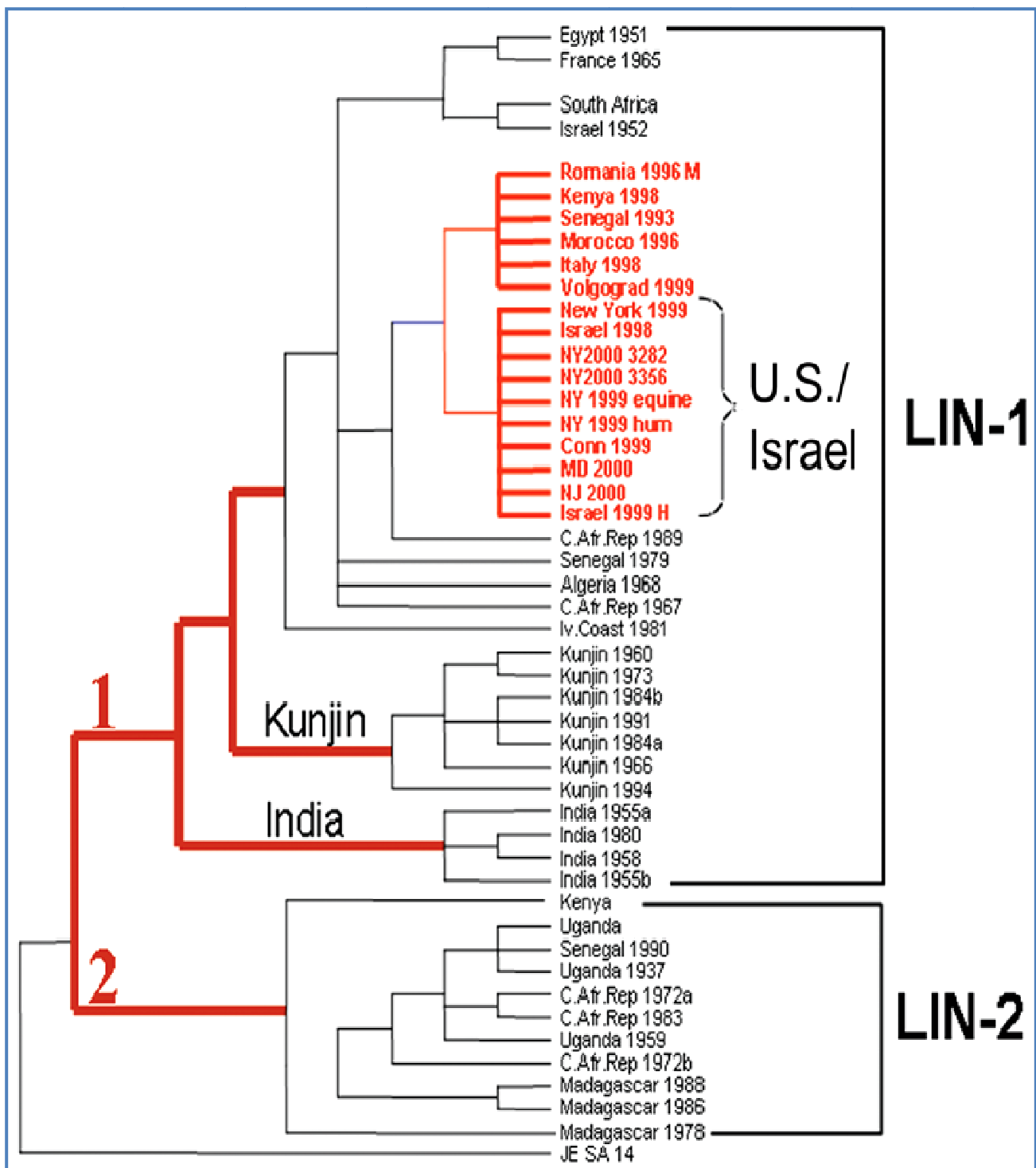


Figura 2. Árbol filogenético del VON basado en la secuencia de la proteína estructural E. Los virus que fueron aislados de las epidemias recientes se muestran con letras en color rojo, todos pertenecen a un mismo grupo y poseen un ancestro común.

I.3 Transmisión y ciclo replicación

El VON es transmitido principalmente por picaduras de mosquitos infectados que adquieren el virus al alimentarse de aves infectadas (Hayes et al, 2005a). El virus es amplificado en los períodos en los que el mosquito adulto se alimenta. Los mosquitos infectados transportan las partículas virales en sus glándulas salivales e infectan especies de aves susceptibles (u otros huéspedes incidentales) mientras se alimentan de su sangre (Dauphin et al, 2004) (Figura 3). Los mosquitos del género *Culex* son los más eficientes para esparcir y transmitir el virus de aves a humanos. Solo las especies de mosquitos que replican el virus y que lo transportan a las glándulas salivales vía hematogena son considerados vectores competentes potenciales (Dauphin et al, 2004).

El VON se ha mantenido mundialmente en un ciclo enzoótico, transmitiéndose principalmente entre aves hospederas y mosquitos vectores. La principal forma de perpetuación del virus en un ambiente con temperaturas adversas es la capacidad que tiene el mosquito adulto para transmitir al virus de manera vertical. Además, el ciclo de transmisión puede también reiniciarse vía la reintroducción del virus por aves que migran en grupos en períodos de invierno o por grupos de aves residentes que transmiten el virus a lo largo de todo el año (Kramer et al, 2007).

Los humanos, caballos y otros mamíferos se consideran huéspedes incidentales debido a que no producen viremias significativas y no contribuyen al ciclo de transmisión. La transmisión del VON a humanos depende en gran medida de los períodos de exposición de la población a los mosquitos (Hayes et al, 2005a). El VON se ha identificado en muchas especies de mamíferos como gatos, perros, conejos, ardillas, cabras, murciélagos, entre otros (Dauphin et al, 2004; van der Meulen et al, 2005). Además el VON se ha identificado en diferentes especies de reptiles, los cuales son capaces de amplificar el virus, presentar viremias altas y en algunos casos manifestar enfermedad neurológica severa (Klenk et al, 2004). Las viremias en los reptiles son de larga duración y pueden mantenerla durante el invierno, lo que permite la supervivencia del virus durante la temporada de frío (Dauphin et al, 2004).

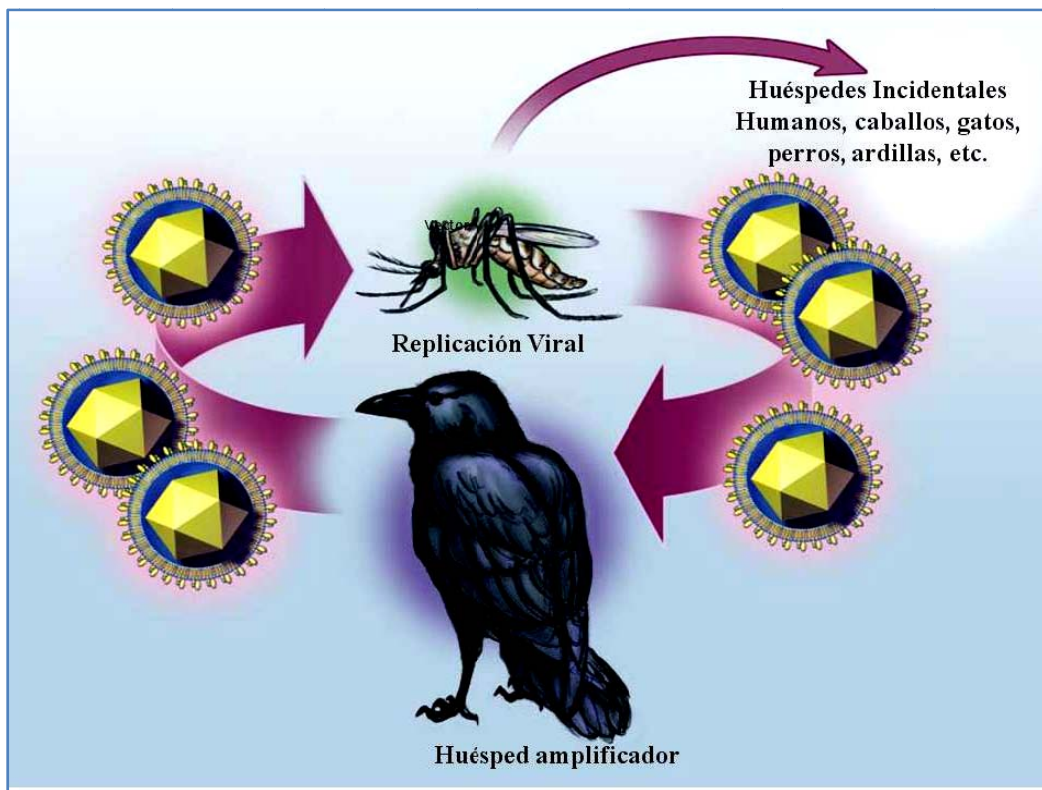


Figura 3. Esquema del ciclo de transmisión del VON. En el ciclo de replicación el virus se replica en aves, mosquitos y huéspedes incidentales. Las aves son los huéspedes amplificadores y transmiten el virus a los mosquitos. Los humanos, caballos y otros mamíferos son considerados huéspedes incidentales o huéspedes finales que no amplifican el virus y por lo tanto no lo transmiten a otros mosquitos.

Además del género *Culex*, el VON se ha identificado en 61 especies diferentes de mosquitos (Dauphin et al, 2004)(Tabla 1). Es importante mencionar que aunque el VON se haya identificado en una gran variedad de mosquitos, para que éstos sean considerados como vectores transmisores se requiere de más investigación que incluya el estudio los siguientes factores:

- a) ASOCIACIÓN: Que exista un contacto del vector con el huésped en condiciones. Naturales
- b) CONEXION ESPECIFICA: Que coincidan el huésped y el vector en tiempo y espacio.
- c) CONSISTENCIA: Que el vector repetidamente porte el estado infeccioso del patógeno (aislamiento del virus en mosquitos de campo, varias veces)
- d) TRANSMISIÓN: Habilidad de transferir el patógeno bajo condiciones controladas.
- e) GRADIENTE BIOLÓGICO: Analizar la densidad del vector y compararla con el número de casos.

Tabla 1. Especies de Mosquitos positivas para el VON en los EUA.

<i>Aedes Aegypti</i>	<i>Culex quinquefasciatus*</i>	<i>Ochlerotatus infirmatus</i>
<i>Aedes Japonicus</i>	<i>Culex restuans</i>	<i>Ochlerotatus japonicas</i>
<i>Aedes albopictus</i>	<i>Culex salinarius</i>	<i>Ochlerotatus provocans</i>
<i>Aedes cinereus</i>	<i>Culex tarsalis</i>	<i>Ochlerotatus sollicitans</i>
<i>Aedesdes hyrcanus</i>	<i>Culex territans</i>	<i>Ochlerotatus sticticus</i>
<i>Anopheles messeae</i>	<i>Culiseta inornata</i>	<i>Ochlerotatus stimulans</i>
<i>Anopheles barberi</i>	<i>Culiseta melanura</i>	<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>
<i>Anopheles cruci</i>	<i>Deinocerites cancer</i>	<i>Ochlerotatus triseriatus</i>
<i>Anopheles punctipennis</i>	<i>Ochlerotatus atlanticus/tormentor</i>	<i>Ochlerotatus trivattatus</i>
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	<i>Ochlerotatus atropalpus</i>	<i>Orthopodomyia signifera</i>
<i>Anopheles walkeri</i>	<i>Ochlerotatus canadensis</i>	<i>Psorophora ciliate</i>
<i>Anopheless/bradleyi</i>	<i>Ochlerotatus cantator</i>	<i>Psorophora columbiae</i>
<i>Coquillettidia perturbans</i>	<i>Ochlerotatus dorsalis</i>	<i>Psorophora ferox</i>
<i>Culex erraticus*</i>	<i>Ochlerotatus fitchii</i>	<i>Psorophora howardii</i>
<i>Culex nigripalpus*</i>	<i>Ochlerotatus dorsalis</i>	<i>Uranotaenia sapphirina</i>
<i>Culex pipiens*</i>	<i>Ochlerotatus fitchii</i>	

* Especies de mosquitos considerados como los principales vectores transmisores del VON.

La habilidad del virus para infectar una gran variedad de especies diferentes de mosquitos ha sido crucial en el establecimiento del virus en EUA. Es muy probable que *Culex pipiens* haya sido el principal mediador del establecimiento del virus gracias a su habilidad de hibernar. La introducción del virus hacia el sur de EUA en zonas más cálidas, garantizó que se estableciera permanentemente con la ayuda de *Culex quinquefasciatum*, el cual se mantiene activo durante todo el año (Granwehr et all, 2004). Debido al gran número de humanos infectados por el VON, en los EUA se han reportado nuevas vías de transmisión de VON. En el 2002 se reportaron los primeros casos de transmisión intrauterina y por lactancia materna (O'Leary et all, 2004). Lo receptores de órganos presentan un riesgo alto de adquirir una infección neuroinvasiva si se exponen al virus por medio de transfusión de sangre y órganos del donador. En el 2002 se reportó el primer caso de transmisión del VON por medio de órganos infectados, en donde cuatro pacientes se infectaron al recibir los órganos de un donador infectado. El riesgo para desarrollar enfermedad neuroinvasiva en un receptor de órganos es del 40%,

comparado con el de la población en general que es menor al 1% (Iwamoto et al, 2003; Kramer et al, 2007). En el 2003 se reportó por primera vez la transmisión del VON por medio de transfusiones sanguíneas (Iwamoto et al, 2003).

Durante el 2003 se inició con la detección del VON en bancos de sangre en EUA. Las muestras de sangre de los donadores se analizan utilizando pruebas de detección del genoma viral. En el 2003 y 2004 se identificaron más de 1000 donaciones de sangre en donde se detectó el RNA viral del VON (Docherty et al, 2004). Además, en el 2004 se documentó la posible transmisión del VON por medio de diálisis (Docherty et al, 2004; Grinev et al, 2008).

I.4 Filogenia

El VON pertenece a la familia *Flaviviridae* en la cual se encuentran tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. Aunque los miembros de los diferentes géneros presentan diferencias en sus genomas, todos tienen un orden similar en sus genes y los motivos de sus proteínas no estructurales se encuentran bien conservados. Los virus que pertenecen a la familia de los flavivirus se dividen en 12 serogrupos antigénicos. El VON es un miembro del grupo del Virus de la Encefalitis japonesa (VEJ), serogrupo que incluye además a Cacicapor, Koutango, Encefalitis Japonesa (EJ), Encefalitis del Valle de Murray, Encefalitis de St Louis (ESL), Usutu y Virus Yaounde (Tabla 2). El Virus Kunjin (VK), el cual es endémico en Australia y Asia, se considera actualmente como un subtipo del VON (Brinton, 2002). Según la sustitución de aminoácidos y las deleciones en la proteína E el VON se ha clasificado en dos linajes (Figura 2).

Tabla 2. Especies de virus incluidos en el género *flavivirus* de la familia *flaviviridae* (NCBI, 2008).

Genero	Grupo	Miembros del Grupo	
Flavivirus (arbovirus grupo B)	<u>Virus del Dengue</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus del dengue (serotipos 1, 2, 3 y 4) 	
	<u>Virus de la encefalitis japonesa</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus de la encefalitis Japonesa • Virus Koutango • Virus del valle de Murray • Virus de la encefalitis de St. Louis • Virus Usutu • Virus del oeste de Nilo <ul style="list-style-type: none"> ❖ <u>Kunjin virus</u> 	
	<u>Virus Kokobera</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Kokobera virus y otros grupos no clasificados 	
	<u>Virus Modoc</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Cowbone Ridge • Virus Jutiapa • Virus San Perlita 	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Modoc • Virus Sal Vieja
	<u>Virus transmitidos por mosquitos</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Ilheus 	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Sepik
	<u>Virus Ntaya</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Bagaza • Virus de la meningoencefalitis de los pavos de Israel. 	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Ntaya • Virus Tembusu • Virus Sitiawan • Virus Yokose
	<u>Virus Rio Bravo</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Apoi • Virus Bukalasa bat • Virus de la Isla Carey • Virus Saboya 	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Dakar bat • Virus Entebbe bat • Virus del Rio Bravo
	<u>Virus transmitidos por vectores Seaborne</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Meaban • Virus Tyuleniy 	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Saumarez Reef
	<u>Virus Spondweni</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Zika • Virus Spondweni 	
	<u>Virus de encefalitis transmitidos por vectores</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus de los bosque de Kyasanur • Virus Langat • Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk • Virus Phnom Penh bat 	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Powassan • Virus de la familia Real • Virus Tick-borne encephalitis
	<u>Virus Yaounde</u>		
	<u>Virus de la fiebre amarilla</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Banzi • Virus Bouboui • Virus Edge Hill 	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Uganda S • Virus Wesselsbron • Virus de la fiebre amarilla

I.5 Estructura del genoma

El genoma del VON está formado por una hebra sencilla de RNA de polaridad positiva con una estructura tipo CAP en el extremo 5' y un extremo terminal CU_{OH} 3'. Los genomas de los flavivirus son los únicos genomas de virus que infectan mamíferos y que no poseen cola de PoliA. El genoma del VON mide 11,023 nucleótidos (nt) de largo, posee un solo marco de lectura abierta de 10,301 nt y codifica para 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales (Figura 4). Las proteínas virales son procesadas por la vía proteolítica, por medio de la proteína viral serin proteasa (NS2B-NS3) y varias proteasas celulares (Brinton, 2002).

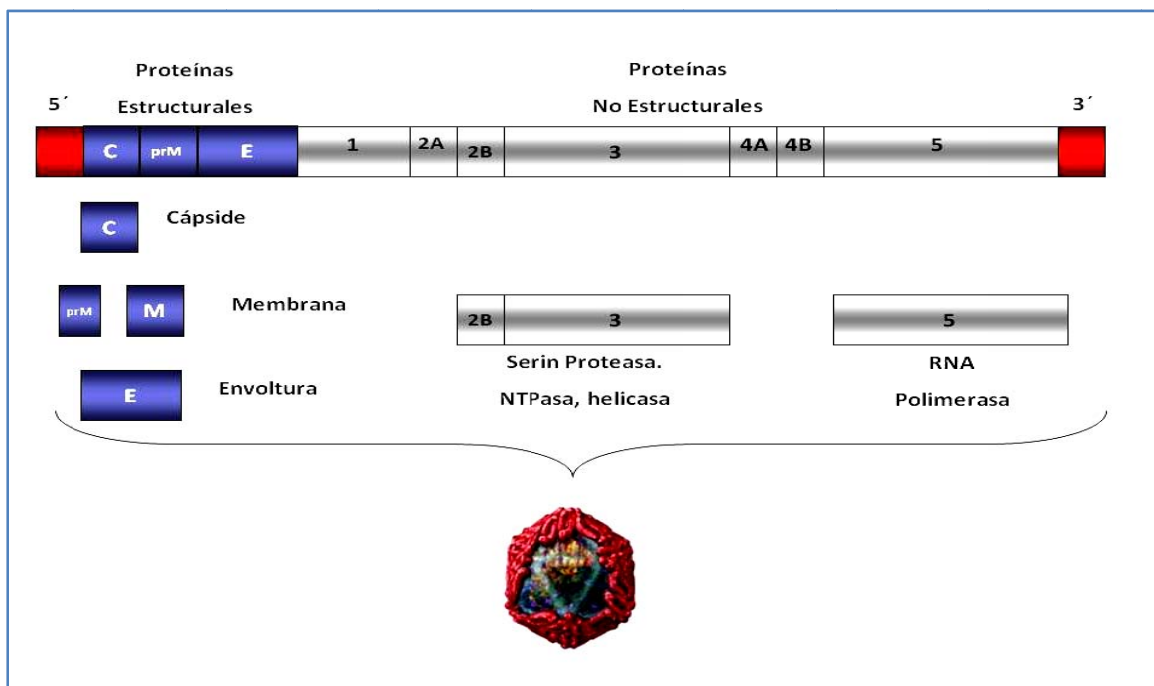


Figura 4. Morfología y composición del VON. La imagen muestra las proteínas estructurales (C, prM y E) y no estructurales (1, 2^a, 2B, 3, 4^a, 4B y 5) del virus del VON.

I.6 Proteínas virales no estructurales

La mayoría de las proteínas no estructurales del VON son multifuncionales, las siete proteínas parecen estar relacionadas directa o indirectamente con la síntesis del RNA viral.

Las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B son pequeñas e hidrofóbicas y se cree que participan facilitando el ensamblaje de los complejos de replicación del virus. En las células infectadas, la proteína NS2B funciona como cofactor de la proteína viral serin proteasa NS3 (Chappell et al, 2008a; Chappell et al, 2008b; Stoermer et al, 2008). El motivo hidrofílico conservado de la proteína NS2B es esencial para la función de cofactor de la proteína (Brinton, 2002).

La proteína NS1 es una glicoproteína con dos sitios de glicosilación conservados y 12 residuos de cisteínas que son esenciales para la viabilidad de virus. NS1 es translocada en el lumen del retículo endoplásmico antes de ser cortada por una proteasa celular. Los estudios indican que la proteína NS1 se une a la proteína NS4 para formar un complejo que es esencial para la síntesis del RNA viral (Brinton, 2002; Wilson et al, 2008).

La proteína NS3 está altamente conservada y codifica para una serin proteasa, la cual es un miembro de la superfamilia de tripsina. Esta proteína es inestable hasta que se une a la proteína NS2B. El complejo NS3-NS2B se requiere para el procesamiento de la poliproteína. Este complejo regula el procesamiento de la proteína preM y promueve la secreción eficiente de las proteínas preM y E. La porción C terminal de la proteína NS3 contiene regiones homólogas a las helicasas. Esta proteína interacciona también con la proteína NS5 y se cree que esta interacción facilita la coordinación entre la helicasa y la polimerasa (Brinton, 2002).

La proteína NS5 se localiza en el extremo C terminal de la poliproteína viral. Es la proteína más grande del genoma del VON, además de ser la más conservada de las proteínas de los flavivirus. La porción del extremo C terminal contiene los motivos característicos de las polimerasas de RNA dependientes de RNA (PRDR) incluyendo el dominio altamente conservado GDD. La región N-terminal contiene un dominio metiltransferasa que funciona en la metilación de tipo Cap I. Los estudios de mutagénesis sitio dirigida indican que las funciones de metiltransferasa y polimerasa son indispensables para la replicación viral (Brinton, 2002; Uchil et al, 2006) .

I.7 Morfología y composición del virión

Los viriones del VON son esféricos, sin proyecciones en la superficie y su tamaño es de aproximadamente 50 nm de diámetro (Mukhopadhyay et al, 2003). Las proteínas M y E se encuentran en la capa más externa de la partícula viral, embebidas en una bicapa lipídica, formando la envoltura del virión (Brinton, 2002; Kramer et al, 2007). Dentro de la envoltura se encuentra el core de la nucleocápside (la cual consiste en múltiples copias de la proteína C) y el RNA viral. Los datos de microscopía electrónica sugieren que la envoltura y la cápside poseen una simetría icosaédrica (Kramer et al, 2007) (Figura 5). La proteína E está formada por tres dominios (I, II y III) y se ha sugerido que los dominios II y III participan de forma importante en la unión al receptor celular (Brinton, 2002).

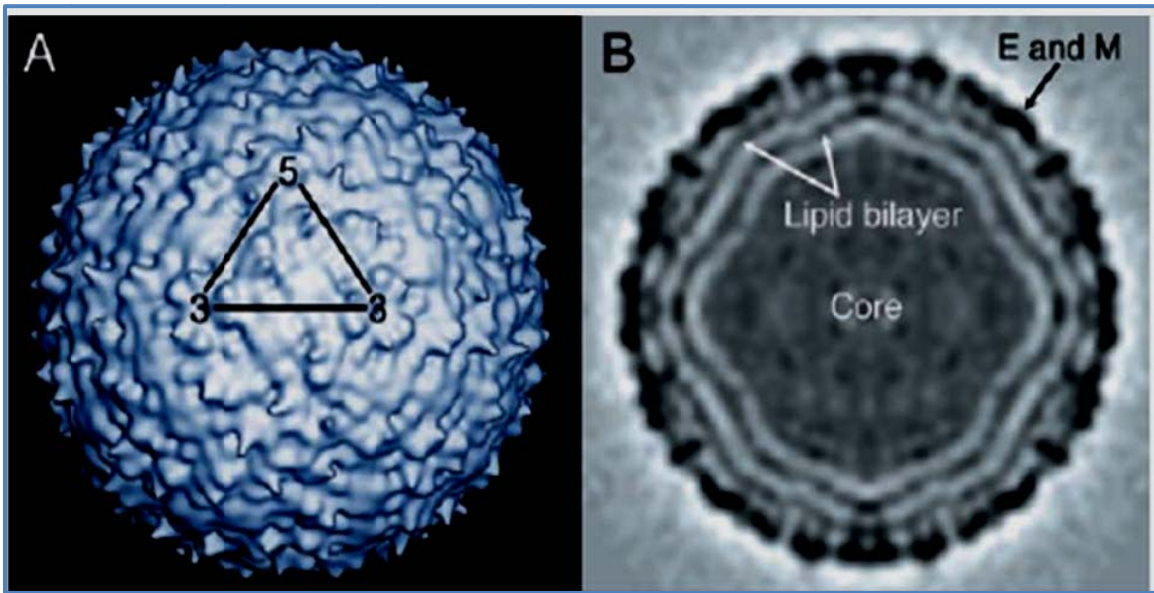


Figura 5. Estructura del VON según una reconstrucción por microscopía crio-electrónica. A) El triángulo indica una unidad con estructura icosaédrica en la superficie del virus. B) La sección central de la reconstrucción muestra capas internas del virus (Mukhopadhyay et al, 2003).

1.8 Ciclo de replicación del VON

La proteína de envoltura de los flavivirus es la responsable del anclaje del virus a los receptores celulares. Se ha propuesto al dominio III de la proteína E como el responsable del anclaje al receptor de la célula blanco. Hasta la fecha se conoce al receptor de integrinas $\alpha V\beta 3$ como al responsable de la unión al dominio III de la proteínas E, aunque no se descarta la posibilidad de que existan otros receptores celulares que el virus utilice para entrar a la célula (Chu y Ng, 2004). La proteína E, por medio de sus dominio III, se une al receptor de Integrinas $\alpha V\beta 3$. Los viriones ingresan a la célula vía endocitosis mediada por receptores, después, en un ambiente a pH bajo, se lleva a cabo la fusión de la membrana viral con la membrana de la vesícula endosomal, liberando la nucleocápside en el citoplasma (Heinz y Allison, 2000). El genoma de RNA se libera y se traduce en una poliproteína. La poliproteína es procesada por la serin proteasa viral NS2B-NS3 y proteasas celulares, se realizan cortes en múltiples sitios y esto genera proteínas virales maduras (Brinton, 2002). La proteína viral PRDR NS5, en conjunto con otras proteínas no estructurales y proteínas celulares, copia múltiples hebras de RNA de polaridad negativa utilizando el RNA viral como templado. Las hebras de polaridad negativa recién sintetizadas, sirven como templados para sintetizar nuevos genomas de RNA viral. La síntesis de RNA viral es semiconservativa y asimétrica. Las proteínas estructurales son transportadas en el citoplasma por medio de vesículas. El ensamblaje del virión se lleva a cabo en asociación con las

membranas del retículo endoplásmico. Los viriones inmaduros son transportados en vesículas del sistema secretor del huésped, en donde las proteínas preM y E se modifican. Los viriones son transportados a la membrana plasmática y se liberan por exocitosis. Las células infectadas liberan los viriones maduros después de 10 a 12 horas de haberse infectado. Las células infectadas también liberan partículas subvirales no infecciosas, las cuales están formadas por membranas celulares con proteínas E, M y preM (Figura 6).

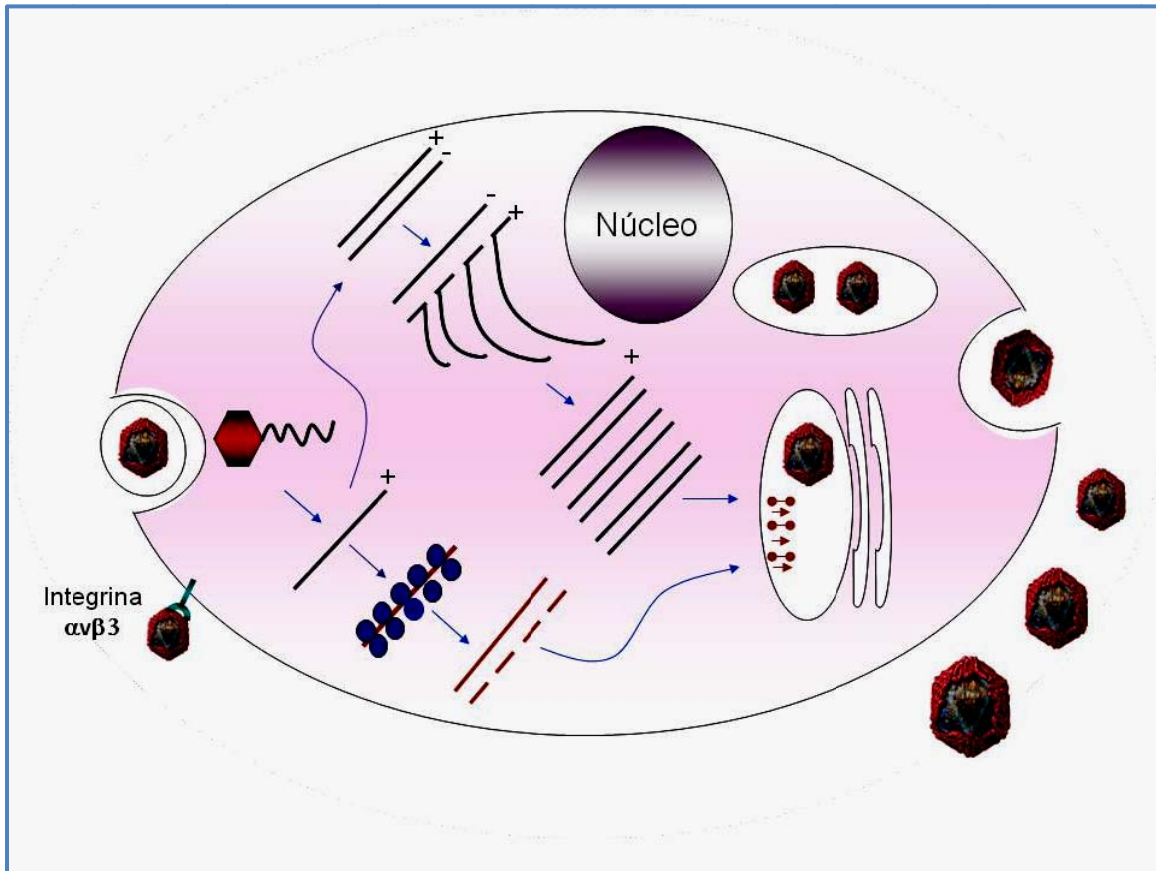


Figura 6. Ciclo de replicación del Virus del Oeste del Nilo. El virus ingresa a la célula al unirse al receptor $\alpha v \beta 3$, el RNA se traduce y la poliproteína sufre una ruptura proteolítica. La hebra de sentido positivo es copiada para producir hebras de polaridad negativa. Las proteínas estructurales son transportadas en el citoplasma por medio de vesículas. El virus se ensambla y es liberado de la célula.

I.9 Proteínas del huésped y resistencia a la infección

Las bases inmunológicas para la resistencia a la infección por flavivirus se han empezado a elucidar gracias al estudio en modelos de roedores y al análisis de la genética humana.

Los estudios en ratones han identificado el alelo del gen 2'-5'-oligoadenilato sintasa 1b (OAS) como responsable del fenotipo a la resistencia a flavivirus. Los ratones que producen proteínas truncadas de OAS son susceptibles a la infección. Experimentos en roedores demostraron que los ratones que

carecen de los sistemas proteín cinasa de RNA de doble cadena activada (PKR) y RNAsa L/2'5'OAS, son altamente susceptibles a sufrir una infección letal por el VON (Samuel et al, 2006).

Otro de los genes involucrados en la respuesta del huésped a las infecciones por VON es el receptor toll like 3 (TLR3) el cual media la respuesta inflamatoria del factor de necrosis tumoral (FNT) el cual a su vez juega un papel muy importante en la penetración del virus al SNC.

Estudios recientes han demostrado que el receptor de citocinas CCR5 juega un papel importante en la infección por el VON en humanos y ratones. Los pacientes con delección en el receptor CCR5 (deltaCCR5) presentan cuadros clínicos neurológicos más severos que aquellos homocigotos normales. Se ha demostrado que aquellos sujetos con genotipo homocigoto delta CCR5 cursan con infecciones sintomáticas del VON. La delección delta CCR5 parece estar asociada con una disminución del tráfico de leucocitos hacia el sistema nervioso central, lo cual aumenta la severidad y el riesgo de muerte en estos pacientes (Diamond y Klein, 2006) (Samuel, 2002).

I.10 Cuadro clínico

Muchos de los miembros de la familia *flaviviridae* causan enfermedad en humanos, incluyendo arbovirus como el virus del Dengue (VD), el VON, el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis Japonesa, el virus del valle de Murray, el VESL, el virus de la encefalitis Japonesa, entre otros. La enfermedad neuroinfecciosa es común en las infecciones por flavivirus especialmente cuando el mosquito del género *Culex* es el vector transmisor predominante (Lanciotti y Kerst, 2001).

En humanos el período de incubación del virus es de 2 a 6 días, extendiéndose en algunos casos hasta 14 días. La mayoría de los pacientes infectados (80%) no presentan síntomas. El 20% desarrolla una fiebre muy similar a otras fiebres producidas por virus como el VD y el virus de la Influenza. Menos del 1% de los pacientes desarrollan síntomas neurológicos (Granwehr et al, 2004; Hayes et al, 2005b).

Los pacientes con fiebre del VON presentan signos y síntomas inespecíficos similares a los de un resfriado. El cuadro clínico inicia con fiebre, escalofríos, malestar general, dolor de cabeza, mialgias, altralgias, dolor retroocular y desorientación. Otros signos inespecíficos de la fiebre por VON son anorexia, vómito, náuseas, diarrea, dolor de garganta, conjuntivitis, hepatitis, esplenomegalia y miocarditis (Solomon et al, 2003; Batalis et al, 2005; Gottfried et al, 2005; Kramer et al, 2007).

El exantema maculopapular lo presentan la mitad de los pacientes infectados (Solomon et al, 2003). Las manifestaciones neurológicas son similares a las presentadas en infecciones por otros flavivirus y el cuadro clínico presentado en cada paciente depende del área del SNC que es afectada (las meninges,

el parénquima cerebral y la médula espinal)(Briese et all, 2000; Bouffard et all, 2004). Los pacientes con síntomas neurológicos presentan diferentes cuadros clínicos que van desde desorientación, convulsiones y rigidez de nuca. Los casos severos pueden desarrollar parálisis flácida aguda, síndrome de Guillain Barré, neuropatía axonal, enfermedad tipo Parkinson, meningitis, encefalitis, meningoencefalitis y muerte (Granwehr et all, 2004).

En la práctica clínica los pacientes con complicaciones neurológicas se clasifican en tres grupos según el síndrome presentado: meningitis por VON, encefalitis por VON y parálisis flácida aguda. Las características clínicas de estos síndromes pueden traslaparse en un solo paciente. Además de estos síndromes pueden presentarse otros, incluyendo rabdomiolisis, coreoretinitis, miositis, la afectación de los nervios autonómicos, hepatitis, pancreatitis, uveítis, orquitis, y virtreitis.

La variabilidad en la presentación clínica de las infecciones por VON muestra la selectividad de este virus por ciertas poblaciones celulares como la sustancia nigra (situada en el mesencéfalo), los ganglios basales y el cerebelo. Las características clínicas de esta infección se presentan también en otras infecciones por flavivirus, por lo que es difícil diferenciarlas clínicamente en la fase aguda de la infección (Kramer et all, 2007).

I.10.1 Meningitis por VON

En la meningitis por VON los pacientes presentan datos clínicos de inflamación meníngea, incluyendo rigidez de nuca, signos de Kernig's o Brudzinski's o fotofobia. Otros datos de la infección aguda incluyen: fiebre mayor de 38°C, hipotermia (<35°C); pleocitosis en LCR (5×10^6 leucocitos/L); cuenta de leucocitos periférica alta ($>10 \times 10^9$) por L; hallazgos de neuroimagen consistentes de inflamación meníngea aguda (Granwehr et all, 2004).

I.10.2 Encefalitis por VON:

Los pacientes con este síndrome presentan alteración de la conciencia, desorientación y signos neurológicos focales (disartria, convulsiones, temblor, ataxia, movimientos involuntarios y parkinsonismo). Los pacientes pueden presentar además: fiebre ($>38^\circ\text{C}$) o hipotermia (<35°C); pleocitosis en LCR ($=5 \times 10^6$ leucocitos/L); cuenta de leucocitos periférica $>10 \times 10^9$ /L; hallazgos de neuroimagen consistentes de inflamación aguda (con o sin inflamación meníngea), desmielinización aguda, presencia de déficit neurológico focal, electroencefalograma consistente con encefalitis, convulsiones de inicio reciente o exacerbación de crisis previas.

Los pacientes con encefalitis por VON tiene un pobre pronóstico si se comparan con aquellos con meningitis por VON. El 76% de los pacientes con meningitis por VON regresan a casa sin necesidad de cuidados médicos especializados, mientras que en la encefalitis alrededor del 75% requieren de estos cuidados médicos.

1.10.3 Parálisis Flácida Aguda

Las características clínicas de las encefalitis y meningitis son familiares para los médicos y el diagnóstico se enfoca de manera rápida a una causa viral. Sin embargo en el caso de una parálisis flácida aguda es clínicamente difícil de diagnosticar ya que no se presenta como un cuadro clínico con el que los médicos estén familiarizados (Granwehr et al, 2004).

Cerca del 10% de los pacientes con infección por el VON que se hospitalizaron en Nueva York en 1999 tenían parálisis flácida aguda, pero no fueron reconocidos como infecciones por VON hasta el año 2002. Durante los años 2002 al 2005 se identificaron un gran número de casos con parálisis flácida aguda por VON. La principal característica clínica fue la parálisis flácida asimétrica. Los pacientes presentaron un cuadro clínico similar a una gripe una o dos semanas antes de iniciar con la parálisis.

La mitad de los pacientes con parálisis flácida aguda presentan debilidad en los músculos faciales. La recuperación de estos pacientes es muy variable y solo un tercio recuperan la habilidad de caminar en el primer año (Kramer et al, 2007) .

El diagnóstico de una parálisis flácida aguda se realiza evaluando los siguientes datos clínicos:

- Aparición rápida de debilidad en extremidades, de progresión rápida en las últimas 24 horas.
- Por lo menos dos de los siguientes datos de debilidad asimétrica: arreflexia, hiperreflexia de los miembros afectados; ausencia de dolor, parestesia, o entumecimiento en el miembro (s) afectado (s);
- Pleocitosis en LCR (igual o mayor a 5×10^6 leucocitos/L) y elevación de proteínas (igual o mayor a 450 mg/L).
- Estudios de electrodiagnóstico consistentes con un proceso de las neuronas del asta anterior, Resonancia Magnética Nuclear de médula espinal que documente aumento en la señal de sustancia gris anterior(Granwehr et al, 2004).

I.10.4 Fiebre Hemorrágica por VON

Las mayoría de las infecciones por el VON son asintomáticas y la enfermedad severa ocurre en la minoría de los pacientes. En África se han reportado algunos casos de pacientes con infección por VON que presentan manifestaciones hemorrágicas difusas, sin embargo esta manifestación clínica no había sido reportada en los EUA. En el 2006 se reportó un caso de infección fulminante por el VON en un paciente de 59 años residente de Florida, el cual murió después de una breve enfermedad hemorrágica. Se pensaba que la muerte de paciente se había debido a una infección causada por *Rickettsia rickettsii*, el virus del dengue o el virus de la fiebre amarilla. Se confirmó la presencia del VON por cultivo viral, microscopía electrónica, PCR e Inmunohistoquímica. El VON fue aislado de una biopsia de piel tomada al paciente poco antes de morir. Además los antígenos virales fueron identificados en células mononucleares, células endoteliales de la piel, pulmón, riñón, bazo y SNC (Paddock et all, 2006). Aunque la enfermedad hemorrágica es una manifestación rara en las infecciones por el VON, estos hallazgos nos permiten evidenciar el amplio espectro de signos y síntomas que este virus puede ocasionar en los pacientes infectados, los cuales pueden ser confundidos con infecciones hemorrágicas causadas por otros virus o bacterias.

I.11 Descripción clínica de casos de infección por arbovirus según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC del inglés Centers for Disease Control and Prevention) de los Estados Unidos de América (EUA)

A continuación se muestran los criterios considerados por los CDC de EUA para clasificar los casos de infección por arbovirus en invasivos y no invasivos.

Para el diagnóstico de la enfermedad neuroinvasiva se requiere de la presencia de fiebre y por lo menos de uno de los siguientes datos clínicos:

- Estado de alteración mental aguda (desorientación, confusión, estupor o coma).
- Otros signos agudos de disfunción neurológica periférica o central (Ej.: paresia o parálisis, afectación de nervios, déficit sensitivo, reflejos anormales, convulsiones generalizadas o movimientos anormales).
- Pleocitosis (incremento en la concentración de células blancas sanguíneas en LCR) asociadas a un cuadro de enfermedad clínicamente compatible con meningitis. (Ej.: dolor de cabeza y rigidez de nuca).

Los CDC clasifican los casos de infecciones por arbovirus como casos confirmados o casos probables, de acuerdo con los siguientes criterios de laboratorio.

- Un incremento de cuatro veces el título de anticuerpos séricos específicos contra el virus.
- Aislamiento del virus o detección del antígeno específico o del genoma viral en sangre, suero, LCR u otra muestra biológica.
- Detección de anticuerpos del tipo IgM específicos contra el virus en LCR por medio de ELISA de captura.
- Detección de anticuerpos del tipo IgM específicos contra el virus en suero por medio de ELISA de captura y analizados por medio de la detección de anticuerpos del tipo IgG en el mismo espécimen u en otra muestra tomada posteriormente. La especificidad de los anticuerpos debe confirmarse con la técnica de inhibición de la hemaglutinación o por Pruebas de Neutralización de Reducción de Placa (PNRP).

I.12 Factores de riesgo del huésped

Los pacientes mayores de 60 años se encuentran en mayor riesgo de desarrollar encefalitis o muerte. Un estudio en la ciudad de Nueva York encontró que la edad mayor de 75 años y la diabetes eran factores de riesgo independientes para desarrollar infecciones severas y muerte (Nash et al, 2001). Otros de los factores que se consideran de riesgo son la hipertensión y la enfermedad cerebrovascular, debido a que pueden facilitar la entrada y replicación del virus en el endotelio de la barrera hematoencefálica. Los pacientes con antecedentes de hipertensión se encuentran en mayor riesgo de desarrollar encefalitis independientemente de la edad o sexo (Granwehr et al, 2004). La hipertensión y la diabetes se consideran factores de riesgo independientes que incrementan el riesgo de morbimortalidad. Se sabe que estos factores incrementan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. En niños, las infecciones por VON no son frecuentes, hasta la fecha no se conocen los factores de riesgo de enfermedad neuroinfecciosa en estos pacientes.

Lo receptores de órganos y los pacientes inmunocomprometidos presentan un riesgo alto de adquirir una infección neuroinvasiva si se exponen al virus por medio de transfusión de sangre, órganos infectados o exposición en la comunidad al virus.

I.13 Diagnóstico

Las especies en las que más frecuentemente se realizan pruebas de diagnóstico para identificar el VON son aves, humanos, caballos y mosquitos. Las principales dificultades para establecer un diagnóstico específico de las infecciones por el VON son: el requerimiento de laboratorios de nivel 3 debido a la naturaleza zoonótica de la infección, la necesidad de analizar multiespecies y la reactividad cruzada de los anticuerpos con otros flavivirus. Además de los métodos de diagnóstico, deben tomarse en cuenta los períodos cortos de viremia y las viremias bajas por las que cursan humanos y caballos (Dauphin y Zientara, 2007).

En humanos y caballos el diagnóstico por el laboratorio es de suma importancia debido a que la mayoría de las infecciones son subclínicas o asintomáticas. En los casos en que las infecciones son sintomáticas, los datos clínicos son inespecíficos y el diagnóstico por el laboratorio es muy importante para establecer la causa de la infección.

I.13.1 Pruebas Serológicas

Las pruebas serológicas son el principal método utilizado para diagnosticar infecciones por VON. La mayoría de las pruebas serológicas detectan anticuerpos anti-proteína E del VON. La principal limitación de estas pruebas es la reactividad cruzada con anticuerpos de otros flavivirus (Kauffman et al, 2003; Wong et al, 2004; Johnson et al, 2005; Dauphin y Zientara, 2007).

I.13.1.1 Pruebas de Neutralización de Reducción de Placa (PNRP)

El estándar de oro para realizar el diagnóstico del VON es la prueba de PNRP al 90% (Dauphin y Zientara, 2007). Esta prueba se utiliza confirmar las pruebas de detección de anticuerpos en suero o líquido cefalorraquídeo. La prueba de PNRP emplea cultivos de flavivirus en células de riñón de mono verde Africano y de riñón de mono Rhesus para identificar los anticuerpos neutralizantes anti diferentes flavivirus en las muestras del paciente. Debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos, en los ensayos de PNRP se utiliza una batería de flavivirus para analizarlos en paralelo. La especificidad de la detección se confirma con un incremento de cuatro veces el título de anticuerpos neutralizantes comparando los anticuerpos de la fase aguda y la fase convaleciente de la infección. Las desventajas que presenta esta prueba son la necesidad de un laboratorio de tercer nivel y se requiere más de una semana de proceso para obtener resultados. Otra de las desventajas es que el costo de este tipo de pruebas es alto debido a que para identificar los anticuerpos neutralizantes se debe realizar un panel de

pruebas para diferentes flavivirus, por lo que es necesario el cultivo de múltiples cepas virales (Johnson et al, 2005).

1.13.1.2 Pruebas de Ensayo Inmunoabsorbente ligado a Enzimas (ELISA).

Las pruebas de ELISA para el VON están basadas en pruebas preexistentes para otros flavivirus. Estas pruebas permiten la detección de anticuerpos IgM, IgG e IgA en suero y LCR de sujetos que han estado en contacto con el virus.

Las pruebas más recomendadas son la ELISA de captura para anticuerpos del tipo IgM (MAC-ELISA) y la prueba de ELISA IgG indirecta. La mayoría de los laboratorios en los EUA realizan este tipo de pruebas, las cuales fueron desarrolladas por los investigadores de los CDC. Estas pruebas presentan la ventaja de que son rápidas, reproducibles y de menor costo que otros métodos. Además, estas pruebas utilizan reactivos no infecciosos, lo cual permite realizar pruebas de primera elección y de monitoreo a gran escala, como el análisis de poblaciones en casos de epidemias o epizooticas. La prueba de MAC ELISA es de gran ayuda para realizar la detección de anticuerpos de respuesta temprana, ya que permite diferenciar entre infecciones recientes, pasadas e individuos vacunados. Entre las desventajas de esta prueba se incluyen los resultados falsos negativos que ocurren en las muestras biológicas de pacientes en fase aguda, ya que los primeros días de infección no se encuentran presentes los anticuerpos del tipo IgM (Figura 7) , en estos casos se recomienda utilizar pruebas de detección del genoma viral por medio de PCR. En algunos pacientes los anticuerpos del tipo IgM persisten por más de 1 año, en estos casos la prueba de MAC-ELISA no puede discriminar entre infecciones recientes y pasadas. Otra de las desventajas es la reactividad cruzada con otros flavivirus. Las muestras de pacientes con pruebas de ELISA positivas deben ser confirmadas con PNRP (Johnson et al, 2003; Tilley et al, 2005).

La prueba de ELISA IgG indirecta fue estandarizada para análisis de suero en humanos, aunque actualmente esta prueba es muy utilizada también en aves y caballos. Uno de los principales problemas de las pruebas serológicas en humanos es su elevada reactividad cruzada con otros flavivirus como el VD, lo que complica el diagnóstico en zonas endémicas para otros flavivirus (Wong et al, 2003; Prince et al, 2004) (Dauphin y Zientara, 2007). La prueba de ELISA IgG es menos específica que la de IgM y se recomienda realizar el diagnóstico del VON utilizando estas pruebas en tándem (Dauphin y Zientara, 2007). La combinación de estas dos pruebas mejora la sensibilidad y especificidad del diagnóstico y permite el acceso al panel completo de anticuerpos.

Los pacientes inmunocomprometidos pueden desarrollar la infección por VON sin producir anticuerpos específicos, en estos casos es más probable que se detecte el RNA viral y se recomienda realizar pruebas de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés Polymerase Chain Reaction) (Granwehr et al, 2004).

Actualmente se encuentran disponibles estuches comerciales para detección de anticuerpos, la mayoría de ellos para humanos. La Administración de Alimentos y Drogas (FDA de sus siglas en inglés Food and Drug Administration) de los EUA aprobó tres pruebas de ELISA IgG y tres de MAC-ELISA IgM para tres compañías (InBios, WA, EUA; Focus Diagnostics, Cipers, CA, EUA y PanBIO, MD, EUA) las pruebas varían en la eficiencia de detección y especificidad. Las pruebas de ELISA de Focus emplean las proteínas preM y E del VON. Las pruebas de IgG e IgM de la compañía Focus tienen mayor eficiencia de detección que las pruebas estandarizadas por los CDC. La eficiencia de detección de la prueba de IgG de los CDC es del 92.1% comparada con la de Focus que es del 97.6%. La prueba de IgM de Focus presenta una eficiencia de detección del 99.3% (Hogrefe et al, 2004; Dauphin y Zientara, 2007). Aunque los estuches de Focus fueron diseñados para la detección de anticuerpos en muestras de suero, también han sido probados en muestras de LCR y se ha comprobado que la prueba permite la detección precisa de anticuerpos en este tipo de muestras (Prince et al, 2004). Los estuches comerciales de pruebas de ELISA IgG e IgM para caballos se encuentran aún en desarrollo.

La prueba de ELISA de bloqueo de epítopes tiene la gran ventaja de que puede ser utilizada en multiespecies. En estas pruebas los anticuerpos de la muestra analizada compiten con anticuerpos del VON que se agregan al sistema. Este método se ha empleado con éxito en diferentes especies de aves y en animales domésticos (Blitvich et al, 2003a; Farfan-Ale et al, 2004; Gibbs et al, 2005; Lefrancois et al, 2005).

La prueba de detección de anticuerpos del tipo IgA permite la detección de anticuerpos en la infección aguda. IgA Esta prueba ha sido utilizada con un marcador neurológico de infección e inflamación, esta inmunoglobulina aparece después de la IgM y antes que la IgG. La prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgA en LCR se utiliza para la detección de la fase aguda de una infección neurológica por el VON. En los casos en los que los anticuerpos del tipo IgM por MAC-ELISA no permiten discriminar entre infecciones recientes y pasadas puede realizarse a la par la detección de anticuerpos del tipo IgA y confirmar si la infección se encuentra en una fase aguda (Prince y Lape-Nixon, 2005; Nixon y Prince, 2006).

I.13.1.3 Otras pruebas serológicas

Otro de los métodos de detección de anticuerpos es el inmunoensayo de fibra óptica para detección de anticuerpos IgG del VON, el cual utiliza biosensores y quimioluminiscencia. Este método es rápido y los ensayos con sueros de ratón han demostrado que esta técnica presenta una mayor eficiencia de detección que las pruebas colorimétricas y de quimioluminiscencia de ELISA (Herrmann et al, 2005).

La prueba de microesferas de poliestireno fluorescentes se basa en la unión covalente de la proteína E del VON a estas microesferas. La reacción se evalúa midiendo la intensidad de la fluorescencia. Este ensayo permite la detección de anticuerpos IgG e IgM en muestras de suero y LCR. Los ensayos con microesferas que utilizan la proteína NS5 del VON permiten discriminar las infecciones por VON, el VD y el VESL.

Las pruebas de Inhibición de la hemaglutinación y las pruebas de inmunofluorescencia indirecta aún se utilizan en algunos laboratorios, pero actualmente se encuentran en desuso (Dauphin y Zientara, 2007).

I.13.2 Pruebas de detección del genoma viral.

Para considerar las pruebas de detección del genoma viral en seres humanos, debemos de tomar en cuenta lo siguiente: cuando una persona ha tenido contacto con el VON, la viremia se inicia unos días después de la infección. La detección del virus es un claro indicativo de infección reciente. La viremia puede detectarse en pacientes con fiebre por VON hasta el cuarto día de inicio de los síntomas (Figura 7), después de este tiempo la posibilidad de encontrar el virus en sangre es muy baja. El período corto de viremia en humanos limita las posibilidades de identificar el genoma viral en muestras de pacientes con más de 4 días de evolución de la enfermedad (Dauphin y Zientara, 2007).

El VON puede detectarse por medio de cultivo celular, transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), PCR en tiempo real, por detección de antígenos e inmunohistoquímica. El aislamiento del virus por medio del cultivo viral sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico de las infecciones causadas por el VON. El cultivo viral presenta las desventajas de que requiere tiempo para el crecimiento del cultivo, además de que debe realizarse en laboratorios de tercer nivel. Además, estos ensayos requieren de muestras de muy buena calidad en las cuales haya partículas infecciosas o el RNA del virus no se encuentre degradado. Las pruebas de detección del RNA del VON son rápidas, específicas y sensibles. Además, permiten el análisis en diferentes tipos de muestras y actualmente son muy utilizadas para detección del virus en vertebrados, mosquitos y muestras de aves.

I.13.2.1 Pruebas de PCR en tiempo real y RT-PCR

Las regiones del genoma del VON más empleadas para el diagnóstico molecular son la región 3' no traducible y la región que codifica para la proteína E, las cuales se encuentran altamente conservadas (Tang et al, 2006). Las pruebas de detección del RNA viral por RT-PCR y PCR en tiempo real presentan la ventaja de ser rápidas, sensibles y permiten el análisis de muestras líquidas (suero, LCR, orina) y sólidas (tejidos).

Los ensayos de PCR en tiempo real con sondas Taq Man permiten la detección de hasta 0.1 unidades formadoras de placas de RNA viral. Una gran ventaja del diseño de las sondas Taq Man es que se obtiene una alta sensibilidad al agregar la sonda Taq Man a la reacción de PCR. La reacción en tiempo real puede realizarse empleando la enzima Multiscribe, la cual permite realizar las reacciones de RT y PCR en un solo tubo, esta metodología permite acortar el tiempo de reacción y disminuir los riesgos de contaminación de la muestra. Las pruebas de PCR múltiplex en tiempo real son ampliamente utilizadas y permiten la detección de diferentes tipos de flavivirus causantes infecciones neurológica virales (VON, VESL, Virus del la encefalitis Japonesa, VD) (Shirato et al, 2005; Tang et al, 2006). Estas pruebas son muy utilizadas en regiones endémicas para varios flavivirus.

La técnica de PCR en tiempo real utilizando SYBR Green tiene la misma sensibilidad que los ensayos con sondas Taq Man, pero con la ventaja de ser menos costosos (Shi et al, 2001; Kauffman et al, 2003; Wong et al, 2004; Johnson et al, 2005; Tang et al, 2006; Dauphin y Zientara, 2007). Las principales desventajas de los ensayos con SYBR Green son que se puede presentar fluorescencia inespecífica si se forman dímeros de oligonucleótidos, dando resultados falsos positivos, además estos ensayos son menos específicos que los ensayos con sondas Taq Man.

Si se combina la extracción de RNA automatizada y el PCR en tiempo real, pueden utilizarse para la detección del VON a gran escala. Estas técnicas son ampliamente utilizadas en los EUA y Europa. Los ensayos de PCR en tiempo real se utilizan frecuentemente en los bancos de sangre en EUA y cerca de 30 millones de donadores han sido analizados por éste método. La FDA aprobó dos pruebas comerciales de PCR en tiempo real: Taq Secreen West Nile Virus Test (Roche Molecular Systems, Pleasanton, EUA), CA, EUA) y Procleix West Nile Virus Assay (Gene Probe Inc, San Diego Ca/Chiron Corporation, Emeryville, CA, EUA). La principal desventaja de estas pruebas es el alto costo, pero si se manejan grandes cantidades de muestras y se analizan en grupos el costo disminuye.

Entre las ventajas de emplear pruebas de PCR en tiempo real se encuentran las siguientes:

1. Al adquirir la sonda Taq Man no es necesaria la estandarización, ya que la compañía provee el protocolo de amplificación.

2. Las muestras se analizan en tiempo real, detectando desde el inicio de reacción la actividad de fluorescencia de cada una de las muestras analizadas.
3. Los resultados se analizan en la pantalla de la computadora sin la necesidad de correr un gel de agarosa para visualizar los productos amplificados, por lo que la placa de amplificación se descarta al terminar el ensayo y se disminuyen los riesgos de contaminación por amplicones.

Algunos ensayos de RT-PCR pueden alcanzar la misma sensibilidad que el PCR en tiempo real (Scaramozzino et al, 2001). El PCR anidado incrementa la sensibilidad, pero presenta el riesgo de contaminación con amplicones. Las pruebas de RT-PCR múltiplex permiten la detección de diferentes especies de flavivirus que ocasionan infecciones neurológicas asépticas. Las pruebas de RT-PCR son, al igual que la técnica de PCR en tiempo real, muy utilizadas en bancos de sangre para detectar donadores virémicos. Estas pruebas son menos costosas que las de PCR en tiempo real.

Las desventajas de las pruebas de RT-PCR y PCR en tiempo real incluyen los falsos positivos debido a contaminación cruzada y los altos costos. Otra desventaja es que todas las muestras positivas deben ser confirmadas por medio de cultivo viral o inmunofluorescencia.

I.13.2.2 Pruebas de detección de antígenos

Las pruebas de detección de antígenos utilizadas en aves y mosquitos en estudios de vigilancia epidemiológica en Norte América permiten realizar el diagnóstico a gran escala y de manera rápida. En estos inmunoensayos se utilizan muestras orofaríngeas tomadas con hisopos y mezclas de mosquitos. Estas pruebas presentan una baja eficiencia de detección (del 60 al 80%), pero su especificidad es satisfactoria (cerca del 95%). Estas pruebas de campo presentan las ventajas de ser pruebas de bajo costo (si comparan con las pruebas de detección del genoma viral y las pruebas de PNRP) y el tiempo de proceso es de 15 minutos.

La prueba de detección del antígenos NS1 del VON por ELISA es una técnica experimental que parece ser un marcador de infección temprana para el VON. El antígeno NS1 puede detectarse antes de que aparezcan los anticuerpos del tipo IgM, por lo que se considera un marcador de infección reciente. Aunque esta técnica es menos sensible que la PCR en tiempo real, puede ser de gran utilidad ya que se puede realizar de forma rápida y tiene una alta especificidad (Dauphin y Zientara, 2007).

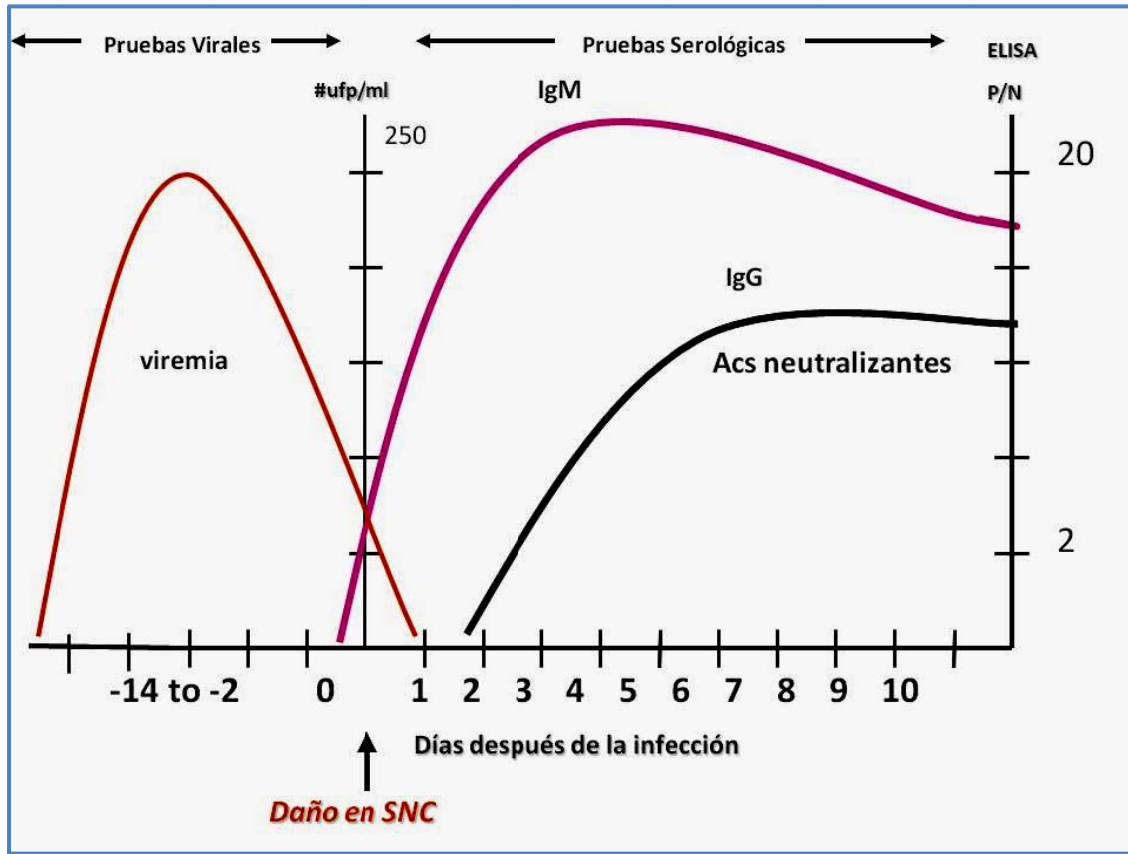


Figura 7. Viremia y respuesta inmune frente a las infecciones por el VON. La línea roja indica la cantidad de virus en sangre, los cuales pueden detectarse solo al inicio de los síntomas, ya que la viremia desaparece rápidamente. Los anticuerpos del tipo IgM pueden detectarse cuando inicia el cuadro clínico y hasta 12 meses después de la infección. Los anticuerpos del tipo IgG se detectan después de dos semanas de haberse iniciado la infección viral.

I.14 Tratamiento

Actualmente no existe un tratamiento específico disponible para las infecciones por flavivirus. Aunque varios compuestos han demostrado suprimir el virus en cultivos celulares, muy pocos de ellos son eficaces *in vivo*. El tratamiento con anticuerpos es uno de los tratamientos más prometedores para tratar la infección por VON (Granwehr et al, 2004). La administración pasiva de anticuerpos monoclonales ha sido previamente utilizada para tratar infecciones de otros flavivirus (VESL, virus de la encefalitis japonesa y el virus de fiebre amarilla).

Otros compuestos que se han estudiado para el tratamiento antiviral son los morfooligómeros de fosfordiamidato (PMOs) los cuales inhiben la infección por VON en cultivos celulares. Los blancos

de los PMOs son secuencias conservadas de los RNAs, las cuales son esenciales para síntesis del RNA viral. Los ensayos *in vivo* han demostrado la protección a la infección en ratones (Kramer et al, 2007). La terapia con interferón alfa 2b a dosis altas está actualmente en investigación en pacientes con meningoencefalitis. Este compuesto ha demostrado la inhibición del VON en cultivo celular pero su efectividad *in vivo* no ha sido comprobada (Anderson y Rahal, 2002).

I.15 Medidas de Prevención y control

La prevención es un factor muy importante para disminuir el número casos de infecciones por el VON en humanos en áreas endémicas. Se recomienda que las personas que viven en áreas en donde el mosquito circula, se protejan usando ropa apropiada y se apliquen repelente que contenga de un 10 a un 30% de N,N-diethyl-3-metilbenzamida. El repelente debe aplicarse sobre la ropa y en la piel expuesta (CDC, 2000b). El tiempo que permanecen los sujetos en el exterior debe minimizarse durante las primeras horas de la mañana y en la tarde, cuando el mosquito pica. Estas recomendaciones son muy importantes para grupos de sujetos en riesgo y para los pacientes inmunocomprometidos. Las medidas de prevención para disminuir el número de mosquitos circulantes incluyen la remoción de reservorios de agua, en donde el mosquito se reproduce y la aplicación de larvicida en los lugares en donde potencialmente puede desarrollarse el vector. En los lugares en donde se presentan brotes, las autoridades públicas deben esparcir piretroides para matar mosquitos adultos (Solomon et al, 2003). En los EUA existe una vigilancia exhaustiva monitoreando mosquitos, aves muertas y pollos centinelas. Actualmente existen vacunas contra el VON para uso veterinario, principalmente en caballos. Las vacunas para humanos se encuentran aún en fases de experimentación. La vacunación sería un método eficiente de protección en humanos durante las epidemias ya que actualmente se considera que el VON nunca será erradicado. La vigilancia activa y las medidas de control ofrecen la mejor expectativa para el control de esta enfermedad emergente (CDC, 2000b).

Debido a que actualmente no existe un tratamiento antiviral contra el VON, el diseño de una vacuna es de gran interés para disminuir el número de casos de infección. Existen dos vacunas contra el VON autorizadas para su uso comercial, disponibles solo en EUA y con uso exclusivo en veterinaria.

Actualmente existen varias vacunas quiméricas en desarrollo. Las vacunas Chimeri Vax™ utilizan la cepa 17D del virus de la fiebre amarilla (VFA), esta cepa de virus vivos es muy segura y puede utilizarse para el desarrollo de vacunas para cualquier flavivirus. Los genes de las proteínas estructurales utilizados como antígenos blanco del flavivirus son reemplazados por los genes de otro flavivirus. Existen tres vacunas Chimeri Vax™ en fases I y II: la vacuna contra el Dengue, la del

VON y la del VEST (Arroyo et al, 2001; Arroyo et al, 2004). La vacuna quimérica VFA-VON se encuentra actualmente en fase I de las pruebas clínicas en humanos. En esta vacuna los genes preM y E del VFA se sustituyeron por los genes pre M y E del VON (Monath et al, 2006).

La otra vacuna en desarrollo es una vacuna quimérica de virus atenuados, esta vacuna se obtuvo insertando los genes de las proteínas M y E del VON en un esqueleto de virus del Dengue tipo 4. Esta vacuna se encuentra actualmente en desarrollo, en espera de iniciar con las pruebas clínicas de fase I en humanos (Pletnev et al, 2000; Pletnev et al, 2002; Pletnev et al, 2003).

I.16 Diseminación del VON en América

Hasta antes de 1999 se habían presentado brotes ocasionales del VON en Europa y Australia y el virus era enzoótico en África, Asia, Medio Oriente y el Mediterráneo.

El primer brote del VON en América se presentó en la ciudad de Nueva York en Agosto de 1999 (Hayes et al, 2005a). Se confirmaron 62 casos de personas infectadas, 59 de los cuales presentaron una infección neuroinvasiva y 7 personas fallecieron a causa de la infección. En un principio se pensó que los casos correspondían a infecciones por el VESL, pero la evidencia serológica y virológica reveló que se trataban de casos de infecciones por el VON. Los estudios serológicos mostraron que ese mismo año se infectaron cientos de personas en la ciudad de Nueva York. Los análisis filogenéticos de la secuencia del virus indican que el virus que ingresó a Nueva York provenía del Medio Oriente, muy probablemente de Israel (Giladi et al, 2001). El virus ingresó al continente americano en la primavera o a inicios del verano en 1999, probablemente con la introducción de mosquitos, aves, humanos u otras especies infectadas por el virus (Giladi et al, 2001). En 1999 el virus se esparció por las ciudades de Nueva York, Connecticut, Nueva Jersey y Baltimore (CDC, 1999). En el año 2000, en Nueva York se reportaron 21 casos en humanos, 19 de los cuales fueron neuroinvasivos y dos personas fallecieron a causa de la infección (CDC, 2000b; CDC, 2000a). Ese mismo año se reportaron casos en humanos en 12 estados desde la costa del Atlántico hasta Carolina del Norte, casos de muertes en aves a causa de esta infección. Para el 2001 el virus se había dispersado en 21 estados, ese año se identificaron 69 casos de infección en humanos y 9 personas que fallecieron a causa de la infección. Ese año se reportaron los primeros casos en Ontario, Canadá. En el 2002 el epicentro de la transmisión se generó en Luisiana, se reportaron 4,156 casos y 284 muertes. En Canadá se reportaron brotes en 5 provincias de la frontera con los EUA. En el 2003 se reportó el mayor brote del VON, con 9,862 casos y 264 muertes en los EUA. En Canadá se reportaron casos en todas las provincias fronterizas con excepción de British Columbia. En el 2004 el número de casos reportados disminuyó a 2,539 casos y 100 muertes. Ese año

en Canadá se reportaron solo 25 casos. En el 2005 se reportaron 3,000 casos y 119 muertes y en el 2006 el número de casos se incrementa a 4,269 y 177 muertes (Figuras 8 y 9). En Canadá se reportaron 380 casos en el 2005 y el 2006.

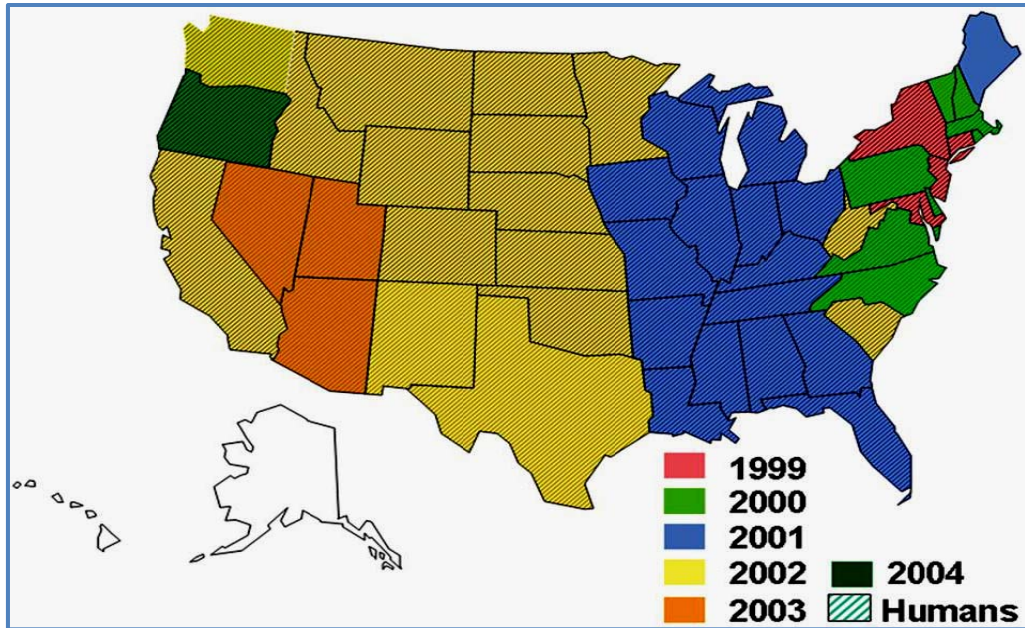


Figura 8. Movimiento secuencial del VON en los EUA por año, según los datos reportados por los CDC. Se muestran los estados que reportaron actividad del VON desde 1999 al 2004.

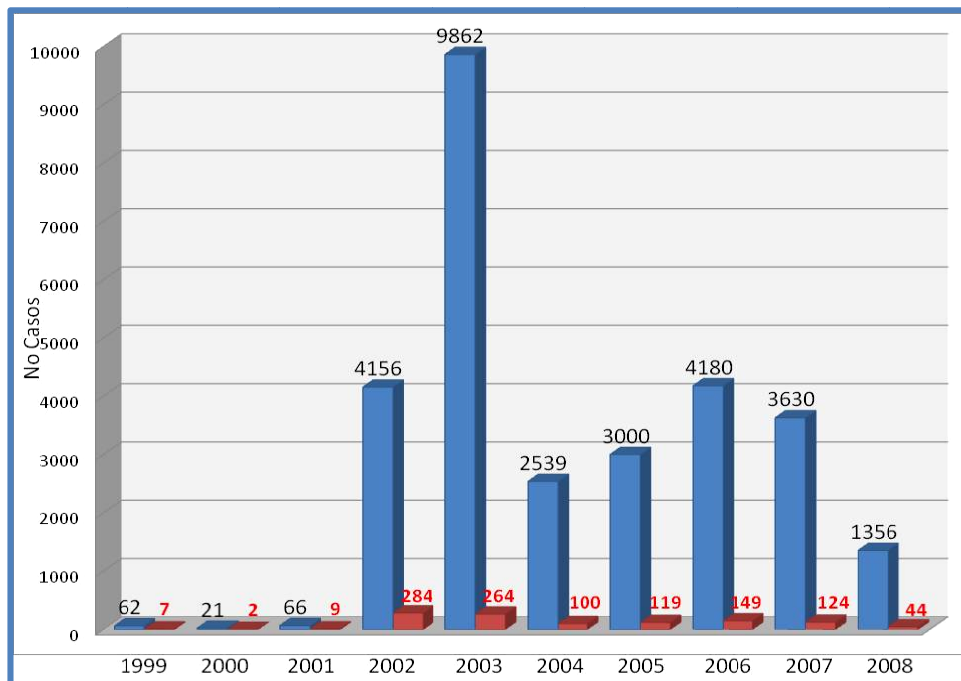


Figura 9. Incidencia del VON en EUA de 1999 al 2008. Las barras azules indican los casos confirmados y las barras rojas corresponden al número de muertes (CDC, 2008).

Además de los reportes de casos en humanos también se han reportaron un gran número de casos de infecciones en equinos. En el 2002 se reportaron 14,571 casos en equinos con un promedio de mortalidad del 30%. El número de reportes de caballos infectados disminuyó dramáticamente en el 2003 y 2004 gracias al uso de la vacuna de virus atenuados, la cual es utilizada ampliamente en los EUA.

En el 2007 los CDC de EUA reportaron un total de 3,630 casos en humanos y 124 muertes a causa de esta infección. Se confirmaron casos en 43 estados, 55% de los cuales se presentaron en mujeres y con una edad media de 51 años (en un intervalo de 1 a 99 años) (Figura 10 y Tabla 3). Se reportó un total de 286 donadores de sangre virémicos (DV) (Figura 11). La mayoría de los DV fueron de los estados de California (46), Texas (40) y Dakota del Norte (27), cuatro fueron de origen Mexicano. Dos de los DV presentaron enfermedad Neuroinvasiva y 59 presentaron Fiebre del VON subsecuentes.

Los reportes de casos de infecciones por VON en animales en el 2007 incluyen 1,599 cuervos muertos, 473 aves muertas (de diferentes especies), 27 ardillas y cuatro perros. Además 33 estados reportaron casos de caballos infectados y se reportó seroconversión en 764 pollos centinelas en 11 estados. Desde 1999 hasta el 8 de Enero del 2009 los CDC han notificado en EUA 28,961 casos de infecciones por el VON con 1,130 fatalidades (Tabla 3)(CDC, 2001).

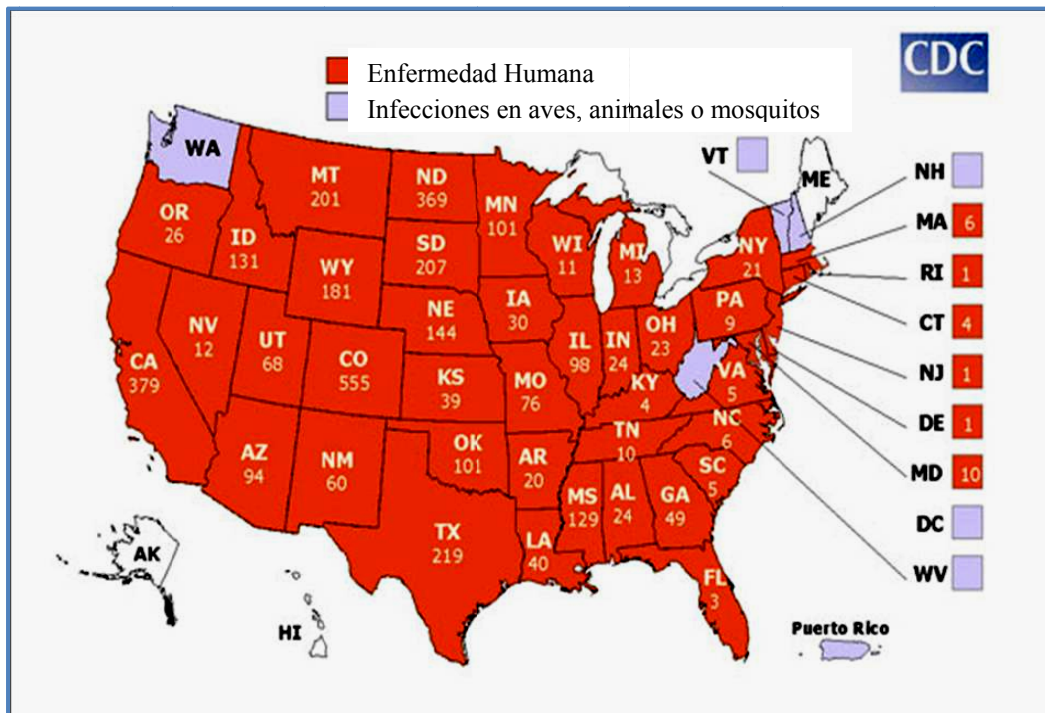


Figura 10. Actividad del VON en EUA en el 2007. Se muestra los estados que reportaron casos confirmados por el VON en el 2007.(CDC, 2008).

Tabla 3. Casos de infección por el VON de 1999 (introducción a América) hasta el 8 de Enero de 2009 en EUA. (CDC, 2008).

Año	Encefalitis/meningitis	Fiebre	Datos cénicos Inespecíficos	Total	Muertes
1999	59	3	0	62	7
2000	19	2	0	21	2
2001	64	2	0	66	9
2002	2,946	1,160	50	4,156	284
2003	2,866	6,830	166	9,862	264
2004	1,142	1,269	128	2,539	100
2005	1,294	1,607	99	3,000	119
2006	1,459	2,616	194	4,269	177
2007	1,217	2350	63	3,630	124
2008	684	624	45	1,356	44
Total	11,753	16,463	745	28,961	1,130

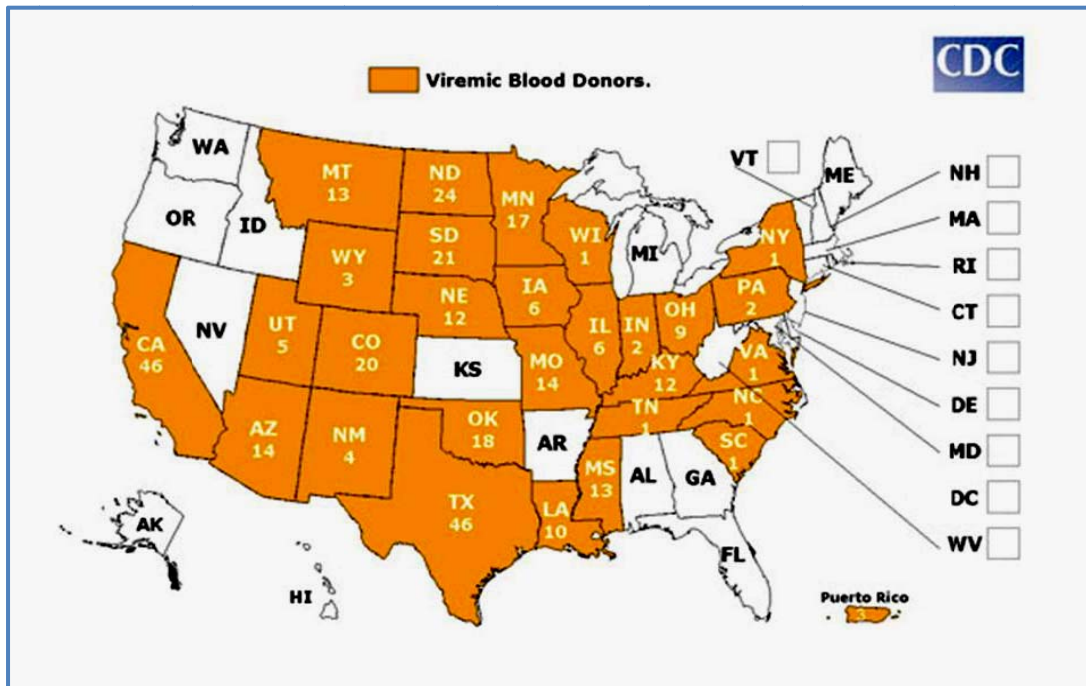


Figura 11. Donadores de sangre virémicos detectados en el 2007 en los EUA. Se muestran los estados que reportaron donadores virémicos y el número de casos reportados en cada estado(CDC, 2008).

Se reportaron en 2008 un total de 1,338 casos en humanos, de los cuales 43 fallecieron a causa de la infección. Se confirmaron casos en 43 estados, 50% de los cuales se presentaron como casos de meningitis o meningoencefalitis. Se reportó un total de 286 donadores de sangre virémicos (DV). Los estados con mayor número de casos fueron California (n=440), Arizona (n=114) y Texas (n=64).

Además de los EUA y Canadá, el virus se ha extendido a otras áreas del continente Americano: En el 2001 se reportó un caso de encefalitis por VON en las Islas Caimán, además de reportes de aves infectadas en Jamaica a principios del 2002. En el 2002 se generaron reportes de aves y equinos en México y en las islas La Española y Guadalupe en el Caribe (Gubler, 2007).

La dispersión del VON en EUA, Canadá y centro y sur América puede ser explicada por el fenómeno de migración de las aves que vuelan en el invierno hacia América central y América del sur y regresan hacia el norte de los EUA y Canadá en primavera (Figura 12). Otro mecanismo que pudo haber facilitado la dispersión del virus del viejo continente al continente americano es la emergencia de una cepa con mayor potencial de virulencia. (Gubler, 2007).

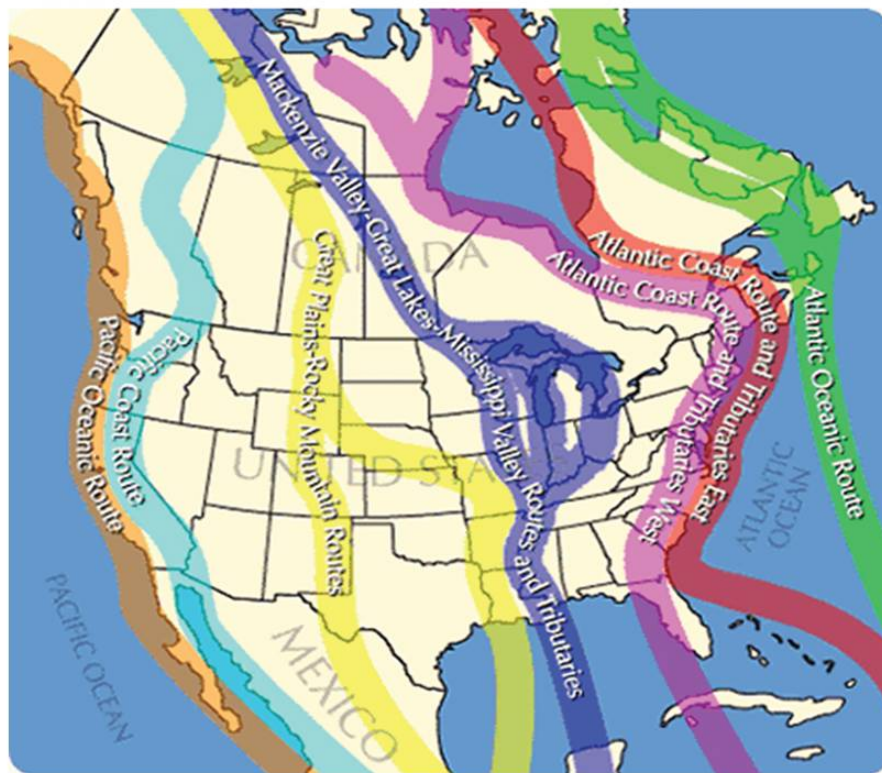


Figura 12. Rutas de aves migratorias del continente americano. En el invierno, las aves vuelan hacia áreas tropicales de América, en donde pasan el invierno. En la primavera, vuelan de nuevo hacia el norte (Gubler, 2007).

En América se han identificado un amplio espectro de huéspedes y vectores del VON, este es otro de los factores importantes del éxito de la dispersión de epidemias y epizootias del VON. Desde su

ingreso a los EUA el virus ha sido aislado de 61 especies de mosquitos, más de 300 especies de aves y más de 30 especies de huéspedes no aviares (Gubler, 2007). Entre los huéspedes vertebrados no aviares se encuentran humanos, equinos, roedores, murciélagos, caninos, felinos, ungulados y reptiles. Aún no se conoce el papel que juegan todas estas especies en la transmisión del VON, pero el hecho de que existan tantas especies de mamíferos y mosquitos infectados con el VON sugiere que existen ciclos de transmisión secundarios. Estos ciclos de transmisión secundarios podrían exponer a humanos y animales domésticos a un mayor riesgo de infección.

Un factor que actualmente se considera muy importante en los brotes de enfermedades infecciosas, es el fenómeno de El Niño. El Centro de Predicción Climática de la Administración Atmosférica y Oceánica Nacional reportó que el incremento de temperaturas en la superficie del océano Pacífico está produciendo patrones de precipitaciones tropicales a nivel mundial, las cuales afectan de manera importante Norte América. Existe evidencia de que estos cambios climáticos aumentan la frecuencia de enfermedades infecciosas, particularmente aquellas que se transmiten por insectos. Es muy probable que el fenómeno de El Niño genere epidemias y epizootias de enfermedades transmitidas por vectores (Anyamba et al, 2006).

I.17 Actividad del VON en México

En México las campañas de vigilancia epidemiológica para detectar actividad del VON iniciaron en el 2001, particularmente en los Estados del Noreste (Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila). Se disparó un estado de alarma epidemiológica en los Sistemas de Salud debido al gran número de reportes de casos en humanos, equinos, aves silvestres y especies de mosquitos vectores infectados con el VON en los estados de Texas y Louisiana de EU.

En el 2002 se notificó un caso de infección en humanos por VON importado de Texas, además de 3 caballos con anticuerpos neutralizantes en Yucatán, 97 caballos seropositivos en los estados Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán, y 15 caballos con anticuerpos neutralizantes en Coahuila (Blitvich et al, 2003b).

En el 2003 se realizaron estudios serológicos en caballos del estado de Coahuila, se analizaron 5 caballos con enfermedad neurológica y los anticuerpos contra el VON se detectaron en todas las muestras. Además, se analizaron otros 19 caballos sin síntomas, resultando positivos 10 de ellos (52%). Todas las muestras fueron confirmadas con ensayos de PNRP (Blitvich et al, 2003b) Ese mismo año se reportó un estudio en donde se analizaron 252 muestras de caballos del estado de Yucatán detectándose seis caballos positivos por pruebas de ELISA, las muestras se confirmaron con ensayos de PNRP y solo

tres de ellas fueron confirmadas como infecciones por VON. En este estudio se reportaron también especies de aves migratorias positivas para el VON (Lorono-Pino et al, 2003). También en el 2003 se reportó un estudio en donde se analizan 441 caballos de 14 estados de la república Mexicana en donde el 22% (97) de las muestras analizadas fueron positivas para anticuerpos contra el VON. Se detectaron caballos infectados en los estados de Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán. En este estudio se evidenció la diseminación del VON en México, además de reportar el primer aislamiento del VON en aves (Cuervo) (Estrada-Franco et al, 2003). Los estudios genéticos indicaron que la secuencia analizada correspondió con un virus que ingresó a México de los estados del centro de EUA.

En el 2004 se aisló el VON en diferentes especies de aves, caballos y mosquitos (*Culex quinquefasciatus*) en Baja California y Nuevo León (Deardorff et al, 2006). Este mismo año se reportó un caso autóctono de infección por el VON en una mujer de 62 años en la comunidad de Etchojoa en el estado de Sonora (Elizondo-Quiroga et al, 2005). Las secuencias de las cepas del mosquito y la del caso reportado en humanos han sido comparadas con las reportadas en EUA y los estudios filogenéticos indican que las dos cepas se introdujeron a México de manera independiente (Elizondo-Quiroga et al, 2005).

En el 2006, Farfán Ale y colaboradores reportaron mamíferos, aves y reptiles seropositivos en la península de Yucatán. En caballos se encontró una seroprevalencia del 58.3% de anticuerpos contra el VON. También se detectaron anticuerpos en 11 aves y 2 mamíferos (coyote y jaguar). Se analizaron muestras de suero de 7 cocodrilos del estado de Campeche y 6 (86%) fueron positivas para anticuerpos contra el VON (Farfan-Ale et al, 2006).

En el 2006 se realizó un estudio en donde se analizaron 3,856 muestras de donadores de sangre provenientes de 29 estados de la república Mexicana y se detectó un donador positivo para anticuerpos del tipo IgM anti-VON. La muestra positiva fue confirmada por medio de la técnica de amplificación mediada por transcripción (Sanchez-Guerrero et al, 2006).

En el 2007 se publicó un artículo en donde se encontraron aves seropositivas para el VON. Tres (2.25%) de 133 muestras de suero de aves colectadas en Lampazos, N.L. dieron positivas en la prueba de ELISA de bloqueo. La especie residente conocida como *Passer domesticus*, “Gorrión doméstico”, demostró la presencia de anticuerpos anti-VON. Se encontró también seropositividad en *Spizella palida*, el “Gorrión color arcilla”, conocido por ser una especie migratoria con hábitos invernales en México. Otra de las especies seropositiva fue *Zonotrichia leucophrys*, “Gorrión de corona blanca”, al igual que la anterior también es una especie migratoria. Además se analizaron muestras en humanos

con estudios serológicos los cuales mostraron que existe una alta reactividad cruzada en los sujetos con probable infección con VON y aquellos que han padecido infección con el virus del dengue. Se analizaron 44 pacientes con infección activa por dengue, 169 pacientes con síntomas clínicos compatibles con fiebre por VON y 24 pacientes con daño en SNC con etiología viral. Estas muestras se analizaron para anticuerpos IgG e IgM. El 40 % de los sueros fueron positivos para anticuerpos IgG contra el VON y 0% fueron positivos para anticuerpos IgM anti-VON. Los resultados de la detección de anticuerpos indican que la alta prevalencia del VD en nuestro país (40%) complica el diagnóstico para el VON en humanos (Fernandez-Salas et al, 2007).

En el 2009 se reportaron en Chiapas muestras de mosquitos positivas por RT-PCR par el genoma del VON y además de detectaron anticuerpos neutralizantes en diferentes especies de animales domésticos (Ulloa et al, 2009).

Los casos de VON reportados en caballos, aves, mosquitos y un caso en humanos en México indican que el VON está activo en diferentes regiones de México, incluyendo la región del Norte y Noreste del país donde la cercanía con EUA es el principal factor de riesgo (Figura 13). Actualmente se desconoce la incidencia real y el impacto en la salud humana de las infecciones por el VON en nuestro país.

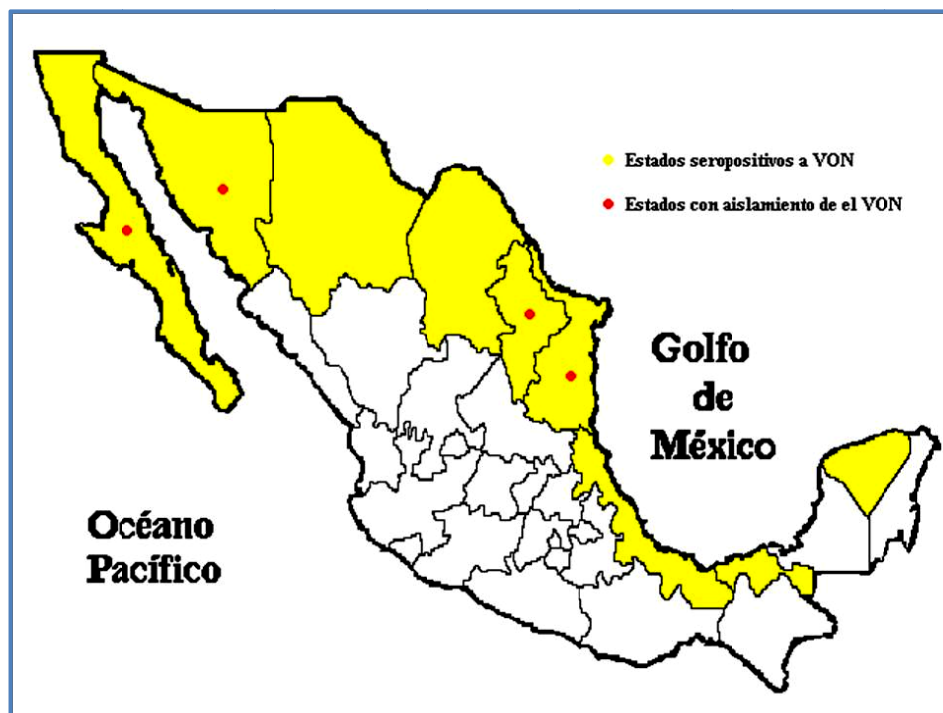


Figura 13. Actividad del VON en México. Se muestran los estados con animales y/o humanos seropositivos para el VON (amarillo) y los estados en donde se aisló el VON (punto rojo). (Beasley et al, 2004; Blitvich et al, 2004; Deardorff et al, 2006).

II. JUSTIFICACIÓN

El VON ingresó al continente Americano en 1999 y desde ese entonces se han presentado brotes anuales en diferentes especies de aves, mamíferos, reptiles y humanos. La infección por el VON es considerada una infección emergente y actualmente se ha comprobado que el virus se ha extendido en Centroamérica y Sudamérica. La infección por el VON ha ocasionado alrededor de 28,900 casos y al menos 1,129 personas han muerto a casusa de esta infección. En nuestro país existen reportes de infección en aves, reptiles, mosquitos y escasos reportes en humanos infectados. El impacto de esta infección emergente en nuestro país no está claro ya que el número de casos reportados en EUA es muy superior a los que se han reportado en nuestro país.

El hecho de que haya reportes escasos de enfermedad neurológica por el VON en humanos en nuestro país, en el Caribe y en Centro América no ha podido ser explicado. Existen diferentes hipótesis para explicar este hecho, las cuales se describen a continuación:

La primera hipótesis señala, que la migración de las aves infectadas con las cepas más virulentas se ve afectada, sin embargo muchas especies de aves no desarrollan enfermedad fatal y su migración no se afecta con la infección. Se tienen reportes de aves con viremias altas que no presentan síntomas de la infección y por lo tanto sus patrones de migración no se ven afectados.

La segunda hipótesis está relacionada con la probable seroprotección al VON gracias a la previa exposición a otros flavivirus como el VD que son endémicos en estas áreas. Aunque actualmente no se tiene evidencia de que exista un seroprotección cruzada en humanos, existe evidencia experimental en roedores de que los anticuerpos heterotrópicos anti-flavivirus pueden modular la enfermedad clínica y reducir las cargas virales.

Una tercera hipótesis señala que existen factores intrínsecos y extrínsecos asociados al huésped y al medio ambiente que permiten la selección de variantes genéticas menos virulentas. Los anticuerpos heterotrópicos pudieran influenciar esta selección. Además los cambios de temperaturas del medio ambiente y las diferentes especies de mosquitos infectadas podrían influenciar en la selección de una cepa menos virulenta.

Por último está la hipótesis que señala que el personal médico de Centro y Norte América y el Caribe no está diagnosticando los casos de infección por el VON debido a que los casos de VON se confunden con otras infecciones por flavivirus como las infecciones por el virus del Dengue.

Indudablemente, la llegada del Virus del Nilo a México viene a sumarse a otras enfermedades emergentes transmitidas por vectores; y plantea un reto a la investigación y a los programas de prevención y control de vectores del sector salud en nuestro país.

En este trabajo nos proponemos contribuir a discernir entre las tres hipótesis que intentan explicar el comportamiento del VON en nuestra región y así ayudar a esclarecer la causa por la cual no se han reportados brotes del VON en humanos en el noreste de México.

III. HIPÓTESIS

Los estudios serológicos y de detección del genoma viral para la identificación de casos potenciales de infecciones por el VON en humanos, podría contribuir a esclarecer la epidemiología y prevalencia del VON en áreas endémicas para el VD.

IV OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la frecuencia de las infecciones por el VON en humanos en el Noreste de México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las pruebas de diagnóstico inmunológico y de detección del genoma viral para el VON.
2. Analizar por medio de pruebas serológicas la frecuencia de exposición al VD en la población estudiada.
3. Buscar la presencia de anticuerpos anti-VON y el genoma del VON en sujetos donadores de sangre asintomáticos, pacientes febriles y pacientes con cuadro clínico neurológico del noreste de México.
4. Evaluar la utilidad de las pruebas de diagnóstico serológico utilizadas actualmente para identificar al VON y su eficiencia en poblaciones endémicas para el VD.
5. Analizar el impacto de las infecciones por el VON en humanos del Noreste de México.

V MATERIAL Y MÉTODOS

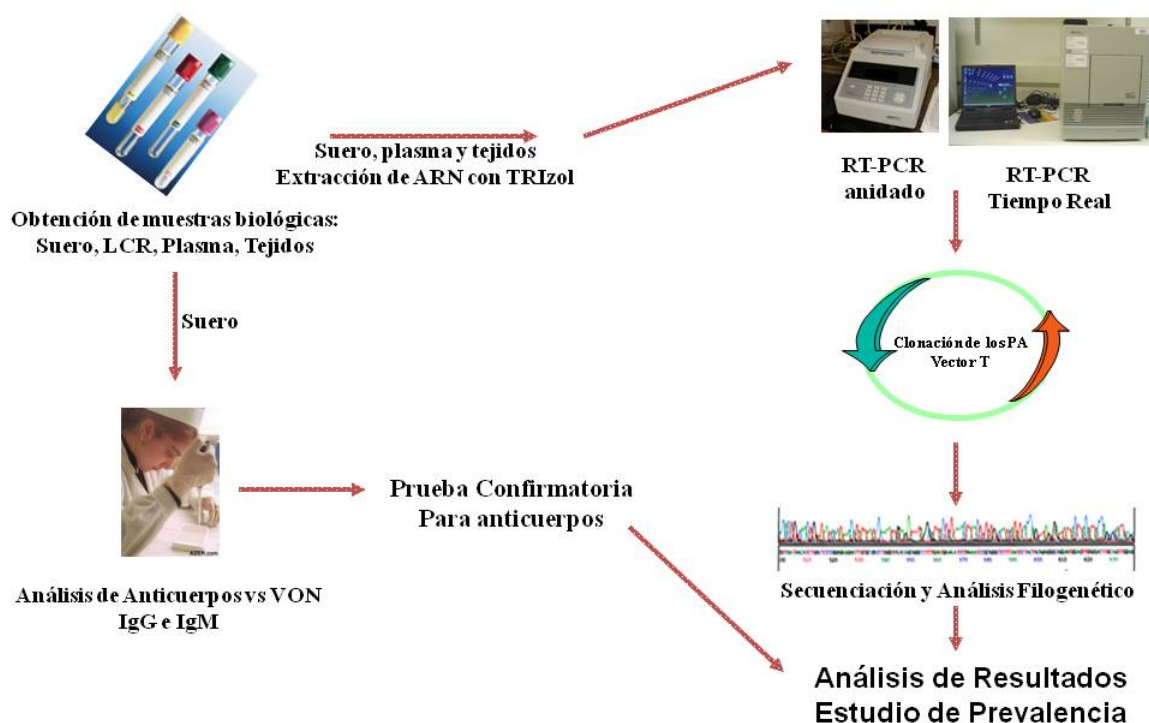


Figura 14. Diagrama de flujo. Se muestra la estrategia general seguida para el desarrollo de este trabajo.

V.1 Origen de los reactivos, material y equipo de laboratorio

V.1.1 Reactivos

V.1.1.1 Pruebas serológicas

Para la detección de anticuerpos del tipo IgG e IgM anti el Virus del Oeste del Nilo (VON) se utilizaron los estuches comerciales WNV IgM capture ELISA y WNV IgG Diagnostic Select ELISA de la compañía FOCUS Diagnostics (Cypress, California 90630, EUA).

Los estuches comerciales utilizados para la detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG anti-VD fueron IgM capture ELISA y el estuche IgG Diagnostic Select ELISA de la marca PANBIO (Inc. 9075 Guilford Rd Columbia, Maryland 21046 U.S.A.).

V.1.1.2 Pruebas De detección del genoma viral

Los reactivos utilizados para la extracción de RNA total a partir de plasma y Líquido Cefalo Raquídeo (LCR) fueron los siguientes: Reactivo TRIzol LS (Invitrogene, Carlsbad, California), Cloroformo, Isopropanol y Etanol absoluto de grado analítico provenientes de la casa comercial Merck® (EM SCIENCE, Gibbstown, NJ, EUA), Glucógeno de la marca Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA) y agua tratada con el inhibidor de RNAsas : dietil pirocarbonato (DEPC).

Los ensayos de PCR Cualitativa en Tiempo Real (qPCR) para la detección de genoma del VON se realizaron en un solo paso utilizando la enzima Multiscribe One-Step Master Mix, oligonucleótidos y Sondas Taq Man de la compañía Applied Biosystems (Foster City CA, EUA).

Para las reacciones de RT se utilizaron reactivos de la marca Invitrogene (Carlsbad, California) los cuales se mencionan a continuación: Enzima MMLV 200U/μL, RNAsin 40U/μL, Buffer 5X, Ditiotrietol (DTT) 0.1M y dNTP's 10mM.

Para la reacción de PCR se utilizaron oligonucleótidos de Applied Biosystems (Foster City CA, EUA), enzima Taq Polimerasa 5U/μL, Buffer 10X, MgCl₂ 50 mM (Invitrogene, Carlsbad, California).

La purificación de las clonas positivas se realizó con el estuche comercial Plasmid Midi Kit de QUIAGEN (California, EUA).

Para la construcción de plásmidos se utilizó RNA viral proveniente de cultivo, el DNA plasmídico se extrajo con columnas de QIAamp Ultra Sens Virus Kit (Qiagen, Valencia, California).

La secuenciación de las clonas positivas se realizó utilizando el estuche BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, California).

Para preparar los geles se utilizó Agarosa (UltraPuraTM Agarosa) de la marca Invitrogen (Carlsbad, California, EUA); para correr el gel se utilizó Buffer TBE 1X (a una concentración de Tris-Base 1 M, ácido bórico 0.09 M y EDTA al 0.002 M) preparado con ácido bórico y Tris- Base de la marca SIGMA CHEMICAL CO (St, Louis, MO, EUA) y EDTA de la marca Amersham/Life Science (Cleveland, OH, EUA). Para la visualización de los geles se utilizó Bromuro de etidio de 100 μg/mL de la marca SIGMA CHEMICAL CO, (St, Louis, MO, EUA).

V.1.2 Material Biológico

Se utilizaron muestras biológicas de suero y LCR provenientes de tres centros de salud: El Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, el Laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud y el Hospital 33 del IMSS.

El RNA del VON proveniente de cultivo viral fue donado por el Dr. José A. Farfán del instituto Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Para la clonación de los productos amplificados (PA) se utilizó el vector pCR-XL-TOPO 3.5 (Invitrogene, Carlsbad, CA) y las células electrocompetentes de *E. coli* Top 10 (Invitrogene, Carlsbad, CA).

Como marcador de peso molecular se utilizó el plásmido pBluescript SK digerido con la enzima Msp II (New England Biolabs. Beverly, MA, EUA)

V.1.3 Equipo

V.1.3.1 Separación de Muestras

Las muestras de suero fueron centrifugadas en una centrifuga Clínica Centra CL2 marca Termo Iec y separadas en una Cabina de Bioseguridad Nivel II marca Lumistell modelo LV-120.

V.1.3.2 Pruebas Serológicas

Las placas de 96 pozos de las pruebas serológicas de ELISA fueron leídas en una lector de ELISA modelo Lambda ELx800 de la marca Bio Tek. Para incubar las placas de ELISA a 37°C se utilizó una incubadora de baño de temperatura en seco modelo I5110 marca Labnet.

V.1.3.3. Pruebas de detección del genoma viral

La extracción de RNA viral y DNA plasmídico se realizó en una Cabina de Bioseguridad Nivel II marca Lumistell modelo LV-120 y una centrifuga refrigerada marca Heraeus (Osterode, Alemania)

Para preparar el gel de agarosa se utilizó un Microondas marca Panasonic y una balanza semianalítica digital modelo APX-203 marca DAIGGER. Para correr los geles de agarosa se utilizó una cámara de electroforesis horizontal modelo B1 marca OWL y la visualización del gel se realizó en un fotodocumentador modelo M 26 E de la marca UVP (Upland, California, EUA)).

Para los ensayos de RT y PCR convencional se utilizó un termociclador de la compañía Applied Biosystems modelo 9700.

Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador de la compañía Applied Biosystems Modelo ABI PRISM modelo 7000.

V.1.4 Programas de análisis computacional

El procesamiento de los datos se realizó en una computadora marca Dell modelo GX260. Para los programas de texto y las bases de datos se utilizaron los programas de Microsoft Office Word y Excel en versiones 2007 de Microsoft Corporation.

Los alineamientos de secuencias nucleotídicas se realizaron en el programa Clustal W versión 2 (Multiple Sequence Alignments). Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR convencional fueron diseñados utilizando los programas Amplify Versión 2000 (Microsoft Corporation) y el programa Oligo 2.0. El diseño de los oligonucleótidos para qPCR se realizó en el programa Primer Express de Applied Biosystems.

Para el análisis de resultados de PCR en tiempo real se utilizó el programa de Sequence Detection System (SDS) Software Versión 1.0 (build 81 rev 3).

V.2 Métodos

V.2.1 Recolección de muestras biológicas

Este trabajo fue evaluado y aprobado por el Comité de ética de la Facultad de Medicina de la UANL y se le asignó el número de clave BI04-003.

Antes de realizar la toma de muestras biológicas a cada sujeto se le invitó a participar en el protocolo. Se realizó una entrevista en donde se explicó verbalmente a cada sujeto en qué consistía el protocolo de investigación. Se recabaron datos epidemiológicos y clínicos a cada sujeto (Anexo 1) y se les solicitó la firma de la Carta de Consentimiento informado (Anexo 2). En el caso de sujetos menores de edad se solicitó la autorización de los padres para ingresar al paciente al protocolo.

La identificación de cada uno de los sujetos incluidos en este estudio fue a través de la asignación de una clave personal y confidencial, la cual consta de una letra y el número correspondiente del sujeto a tres dígitos (ejemplo: F001).

De cada sujeto se obtuvieron dos tubos de sangre: uno con anticoagulante EDTA (para la obtención de plasma) y otro sin anticoagulante con aproximadamente (para la obtención de suero). El plasma y suero fueron separados mediante centrifugación a 3.000 rpm, durante 10 min. Cada tubo fue etiquetado con la clave personal de acuerdo a la base de datos creada para todos los sujetos de estudio.

Las muestras de LCR se transportaron al laboratorio antes de 1 hora de haberse recolectado y se hicieron alícuotas en volúmenes de 1 mL en microtubos.

Todas las muestras de suero, plasma y LCR fueron guardadas a -80°C en criocajas hasta ser procesadas.

De acuerdo a la información recabada con la encuesta de cada uno de los sujetos se realizó una base de datos, la cual se utilizó para realizar estudios de seroprevalencia y de asociación con datos epidemiológicos y hallazgos experimentales.

Los datos de identificación de los sujetos incluidos en este estudio así como los hallazgos experimentales en asociación con claves personales y confidenciales están restringidas teniendo acceso a esta información solo los responsables del proyecto.

V.2.2 Sujetos de estudio

En este estudio se incluyeron 1432 sujetos divididos en tres grupos de estudio, los cuales se describen a continuación:

Grupo I: En este grupo se incluyeron 800 sujetos asintomáticos donadores de sangre que asistieron al Banco de Sangre del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” durante el período del mes de diciembre del 2006 hasta el mes de septiembre del 2007. Este grupo corresponde al grupo de controles sanos, a los cuales se les recolectaron muestra de sangre.

Grupo II: Se incluyeron 588 sujetos con fiebre sugestiva de una infección viral que asistieron a las clínicas de la Secretaría de Salud de N.L. Las muestras fueron recolectadas en el laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud de N. L. en el período de octubre del 2005 a mayo del 2006. En este grupo se recolectaron únicamente muestras de suero.

Grupo III: Se incluyeron 44 sujetos con manifestaciones clínicas de neuroinfección aséptica, a los cuales se les recolectaron muestras de suero y LCR, y que fueron atendidos en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y el Hospital 33 del IMSS durante el período de marzo del 2005 a julio del 2007.

V.2.3. Criterios de inclusión y exclusión

A continuación se describen los criterios de inclusión y exclusión para los grupos de estudio. Los criterios para el grupo I fueron diferentes que los del los grupos II y III, ya que el grupo I incluyó exclusivamente sujetos asintomáticos.

1) Grupo I:

Criterios de Inclusión

- a) Sujetos donadores de sangre de ambos géneros.
- b) Sujetos que aceptaron y contestaron la encuesta requerida y que firmaron la carta de consentimiento informado.

Criterios de Exclusión:

- a) Sujetos que no aceptaron participar en el protocolo.

Criterios de Eliminación

- a) Sujetos positivos para alguna de las pruebas del perfil de donador (VIH-1, VHC, VHB, Brucella VDRL) que se practican de rutina en el banco de sangre.
- b) Mala calidad de la muestra.

2) Grupos II y III**Criterios de Inclusión**

- a) Sujetos de ambos géneros.
- b) Pacientes con probable diagnóstico de encefalitis, meningitis o meningoencefalitis de origen desconocido.
- c) Pacientes con enfermedad febril que apareció súbitamente acompañada de algunos de los siguientes síntomas: malestar general, anorexia, náusea, vómitos, dolor ocular, cefalea, mialgia, erupción cutánea en el pecho, estómago y espalda, linfadenopatía, debilidad, síntomas gastrointestinales y cambios en el estado mental.
- d) Pacientes con fiebre alta acompañada de manifestaciones neurológicas tales como dolor de cabeza, rigidez en el cuello, ataxia y signos extrapiramidales, anormalidades en los nervios craneales, mielitis, neuritis óptica, poliradiculitis, aletargamiento, desorientación, coma, temblores, convulsiones, debilidad muscular, pérdida de la visión, entumecimiento, parálisis y crisis convulsivas..
- e) Pacientes que aceptaron participar en el protocolo con firma de carta de consentimiento.

Criterios de Exclusión

- a) Pacientes que no aceptaron participar en el estudio.
- b) Pacientes menores de edad cuyos familiares no aceptaron la participación en el estudio.

Criterios de Eliminación

- a) Pacientes con meningitis, encefalitis o meningoencefalitis bacterianas, micóticas o con diagnóstico viral confirmado para otros tipos de virus.
- b) Pacientes que en el transcurso del estudio fueron diagnosticados para cualquier otro tipo de agente.

- c) Sujetos que decidieron abandonar el protocolo.
- d) Mala calidad de la muestra

V.2.4 Pruebas serológicas

Las muestras de sangre completa recolectada fueron centrifugadas 15 min a 3,000 rpm para separar el suero. Una vez centrifugadas, las muestras fueron guardadas en alícuotas de 1 mL en microtubos de 1.5 mL y se congelaron a -80°C . A las muestras de suero y LCR recolectadas se les realizaron estudios serológicos para la detección de anticuerpos de respuesta primaria de tipo IgM anti-VON y el Virus del Dengue (VD). El análisis de anticuerpos de tipo IgM se realizó en grupos de 5 muestras de suero por pocillo de la placa. Los grupos de muestras con resultados positivos se analizaron de manera individual. A un subgrupo de muestras de los cuatro grupos de estudio se les realizaron además pruebas de detección de anticuerpos de memoria IgG anti-VON ($n= 332$) y anti-VD ($n= 374$) y pruebas de neutralización de reducción en placa (PNRP) ($n= 147$). Las muestras para detección de anticuerpos del tipo IgG por ELISA se analizaron individualmente en cada pocillo de la placa. En cada uno de los ensayos realizados para anticuerpos IgG e IgM para el VON y el VD se analizaron testigos negativos (N), testigos positivos (P) y calibradores de punto de corte por triplicado (CO).

V.2.4.1 Detección de anticuerpos de tipo IgM anti-VON por ELISA

El ensayo de ELISA Focus Diagnostics West Nile Virus IgM Capture DxSelect™ está diseñado para la detección cualitativa de anticuerpos de tipo IgM frente al VON en suero (Anexo 3).

Protocolo:

1. Se realizaron las diluciones de las muestras, calibradores y controles. A 10 μL de suero, LCR, testigo positivo, negativo o calibradores se añadieron 1,000 μL de diluyente de suero y se mezclaron con Vortex (dilución 1:101). En un pocillo se agregaron 100 μL de diluyente de muestra para tomar este pocillo como blanco del ensayo.
1. Para reconstituir un vial del antígeno, se agregaron 8 mL del diluyente de la muestra.
2. Los pozos de la placa fueron llenados con 250 μL de amortiguador de lavado diluido (1X Wash Buffer solution), incubándose por 5 m. El amortiguador se descartó y se sacudió la placa en papel absorbente para asegurar que los pozos estuvieran secos.
3. Se agregaron 100 μL del diluyente de muestra, de muestra diluida, de los testigos y del calibrador del punto de corte en los pozos correspondientes.
4. La placa se cubrió e incubó durante 60 ± 1 min a temperatura ambiente (20 a 25°C).

5. Después de la incubación la placa se decantó y se lavó tres veces cada pocillo con 250 μL de amortiguador de lavado diluido (1X Wash Buffer). En el último lavado se incubó el tapón de lavado durante 5 min y se decantó.
6. A cada pocillo de la placa se añadieron 100 μL del antígeno previamente mezclado.
7. La placa se cubrió e incubó durante 120 ± 1 min a temperatura ambiente (20 a 25°C).
8. La placa se lavó como se describió en el paso 6.
9. A cada pocillo de la placa se le añadieron 100 μL del conjugado (IgM Conjugate).
10. La placa se cubrió e incubó durante 30 ± 1 min a temperatura ambiente (20 a 25°C).
11. La placa se lavó como en el paso 6.
12. Se agregaron 100 μL del sustrato (Substrate Reagent) a cada pocillo.
13. La placa se cubrió e incubó durante 10 ± 1 min a temperatura ambiente (20 a 25°C), contando el tiempo a partir de que se agregaron el H_2O_2 y el TMB a los primeros pozos.
14. A cada pocillo de la placa se añadieron 100 μL de la solución bloqueadora (Stop Reagent) en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que para la adición del sustrato. Se mezcló con agitación suave.
15. Antes de 60 m, se leyó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm.

Evaluación de los resultados de la técnica de ELISA IgM vs VON:

1. Se calculó la media de la absorbancia de los triplicados del calibrador del punto de corte. Este fue el valor del punto de corte.
2. El valor de índice se calculó dividiendo la absorbancia de la muestra menos el valor del blanco por el valor del punto de corte menos el valor del blanco (calculado en el paso anterior).

$$\text{Valor de Índice} = \frac{\text{Absorbancia de muestra} - \text{Absorbancia de blanco}}{\text{Absorbancia de calibrador} - \text{Absorbancia de blanco}}$$

3. Los resultados fueron interpretados (Tabla 4)

Tabla 4: Interpretación de resultados para la detección de anticuerpos del tipo IgM anti-VON por medio la prueba de ELISA

ÍNDICE	RESULTADO
<0,9	Negativo
≥0,9 a ≤1.1	Indeterminado
≥ 1,1	Positivo

V.2.4.2 Detección de anticuerpos de tipo IgG anti- VON por ELISA

El ensayo de ELISA Focus Diagnostics West Nile Virus IgG DxSelect™ está diseñado para la detección cualitativa de anticuerpos de tipo IgG frente al VON en suero. El ensayo esta indicado para personas que presentan síntomas de meningoencefalitis, como ayuda en el diagnostico de laboratorio presuntivo de infección por el VON (Anexo 3).

Protocolo:

1. Se utilizaron 10 µL de muestra, testigo positivo, negativo y calibradores a los cuales se añadieron 1,000 µL de diluyente de suero y se mezcló con Vortex (dilución 1:101). En un pocillo se agregaron 100 µL de diluyente de muestra para tomar este pocillo como blanco del ensayo.
2. Los pozos de la placa fueron llenados con 250 µL de solución de amortiguador de lavado diluido (1X Wash Buffer solution), incubándose por 5 min y decantando vigorosamente y completamente el amortiguador, después sacudiendo con sanitas para asegurar que estén secos los pozos.
3. Se agregaron 100 µL del diluyente de muestra para utilizarlo como blanco, 100 µL de cada muestra diluida de suero, de los testigos y del calibrador del punto de corte en los pozos correspondientes.
4. La placa se cubrió e incubó durante 60 ± 1 min a temperatura ambiente.
5. Después de la incubación la placa se decantó y se lavó cada pocillo con 250 µL de amortiguador de lavado diluido tres veces. En el último lavado se incubó la placa con el amortiguador de lavado durante 5 m.
6. A cada pocillo de la placa se le añadieron 100 µL del conjugado IgM.
7. La placa se cubrió e incubó durante 30 ± 1 min a temperatura ambiente.
8. La placa se lavó como en el paso 5.

9. La placa se cubrió e incubó durante 10 ± 1 min a temperatura ambiente, contando el tiempo a partir de que se agregaron el sustrato a los primeros pozos.
10. Se detuvo la reacción añadiendo a cada pocillo de la placa 100 μ L de la solución bloqueadora (Stop Reagent) en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que para la adición del sustrato. Se mezcló con agitación suave.
11. Se leyó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm antes de 60 min.

Evaluación de los resultados de la técnica de ELISA para detección de anticuerpos de tipo IgG anti-VON.

1. Se calculó la media de la absorbancia de los duplicados del calibrador del punto de corte. Este fue el valor del punto de corte.
2. El valor de índice se calculó dividiendo la absorbancia de la muestra menos el valor del blanco por el valor del punto de corte menos el valor del blanco (calculado en el paso anterior).

$$\text{Valor de Índice} = \frac{\text{Absorbancia de muestra} - \text{Absorbancia de blanco}}{\text{Absorbancia de calibrador} - \text{Absorbancia de blanco}}$$

3. Interpretación de Resultados de acuerdo a un intervalo preestablecido (Tabla 5).

Tabla 5: Interpretación de resultados para la detección de anticuerpos de tipo IgG anti- VON por medio la prueba de ELISA

ÍNDICE	RESULTADO
<1,3	Negativo
$\geq 1,3$ a $<1,5$	Indeterminado
$\geq 1,5$	Positivo

V.2.4.3 Detección de anticuerpos de tipo IgM anti-VD por ELISA

El ensayo de ELISA Dengue IgM Capture de PANBIO está diseñado para la detección cualitativa de anticuerpos de tipo IgM frente al antígeno del VD en suero, como una herramienta en el diagnóstico del laboratorio clínico de pacientes con síntomas clínicos consistentes con fiebre del dengue (Anexo 3).

Protocolo:

1. Se diluyeron 10 μL de cada muestra de suero, LCR, testigos positivos, negativos y calibradores en 1,000 μL de diluyente (dilución 1:101). Se mezclaron con Vortex.
2. Preparación del antígeno: Se determinó el número de pozos requerido para el ensayo y se realizaron los cálculos necesarios para la preparación del antígeno diluido. Se diluyó el antígeno 1/250 con el diluyente del antígeno. Para cada tira de pozos se utilizó un volumen de 0.5 mL del antígeno diluido. El antígeno concentrado que no fue utilizado se mantuvo de 2 a 8°C.
3. Se extrajo el volumen requerido del antígeno diluido y se mezcló con el mismo volumen de conjugado del anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG humana con la enzima peroxidasa (AcMo-HPR) (trazador). Se mezcló suavemente la solución del antígeno y AcMo-HPR y se dejó reposar a temperatura ambiente (20-25°C) por lo menos 10 m.
4. Se añadieron 100 μL de la muestra biológica diluida, de los testigos y del calibrador del punto de corte en los pozos correspondientes.
5. La placa se cubrió e incubó durante 1 hora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en baño maría.
6. Después de la incubación la placa se decantó y lavó seis veces con la solución comercial de lavado evitando la formación de burbujas para un máximo desempeño del lavado.
7. A cada pocillo de la placa se añadieron 100 μL de los complejos antígeno-AcMo-HPR previamente mezclados.
8. La placa se cubrió e incubó durante 1 hora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en baño maría.
9. La placa se lavó como se describió en el paso 7.
10. A cada pocillo de la placa se añadieron 100 μL de TMB.
11. Se incubó la placa durante 10 min a temperatura ambiente (20-25°C), cronometrando desde la primera adición de TMB/H₂O₂.
12. Se añadieron 100 μL de la solución bloqueadora a cada pocillo en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que para la adición de TMB. Se mezcló con agitación suave. En los pozos con anticuerpos positivos el color azul cambió a amarillo.
13. Se leyó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm y utilizando un filtro de referencia de 600 nm, antes de 30 min.

Evaluación de los resultados de la técnica de ELISA IgM vs VD:

1. Se calculó la media de la absorbancia de los triplicados del calibrador. Este fue el valor del punto de corte.

2. El valor de índice se calculó dividiendo la absorbancia de la muestra entre el valor del punto de corte (calculado en el paso anterior).
3. Las unidades PANBIO se calcularon multiplicando por 10 el valor de índice (calculado en el paso 2).

Valor de índice = Absorbancia de la muestra / Valor del punto de corte

Unidades PANBIO = Valor de índice X 10

4. Interpretación de resultados de acuerdo a un intervalo preestablecido (Tabla 6).

Tabla 6. Interpretación de resultados para la detección de anticuerpos de tipo IgM anti-VD por medio la prueba de ELISA

ÍNDICE	UNIDADES PANBIO	RESULTADO
≤ 0,9	≤ 9	Negativo
0,9 a 1,1	9 a 11	Indeterminado
≥ 1,1	≥ 11	Positivo

V.2.4.4 Detección de anticuerpos de tipo IgG anti- VD por ELISA

El ensayo de ELISA Dengue IgG Indirect de PANBIO está diseñado para la detección cualitativa de anticuerpos de tipo IgG frente a antígenos del dengue de diferentes serotipos (1, 2, 3 y 4). Esta prueba se emplea como ayuda en el diagnóstico del laboratorio clínico de pacientes con síntomas clínicos y una exposición pasada consistente con fiebre del dengue. También puede ser usado para distinguir entre infección primaria o secundaria por el VD (Anexo 3).

Protocolo:

1. Se diluyeron 10 µL de cada muestra de suero, LCR, testigos positivos, negativos y calibradores en 1,000 µL de diluyente (dilución 1:101). Se mezclaron con Vortex.
2. Se añadieron 100 µL de la muestra diluida, de los testigos y del calibrador del punto de corte en los pozos correspondientes.
3. La placa se cubrió e incubó durante 30 min a 37 ± 1°C en baño maría.
4. Después de la incubación la placa se decantó y lavó seis veces con amortiguador de lavado diluido al 1X evitando la formación de burbujas para un máximo desempeño del lavado.
5. A cada pocillo de la placa se añadieron 100 µL de anti-IgG humana conjugada con HRP.
6. La placa se cubrió e incubó durante 30 min a 37 ± 1°C en baño maría.

7. Se lavó la placa como en el paso 4.
8. Se añadieron 100 µL de TMB a cada pocillo de la placa.
9. Se incubó la placa durante 10 min a temperatura ambiente (20-25°C), cronometrando desde la primera adición de TMB/H₂O₂. Apareció un color azul.
10. A cada pocillo de la placa se añadieron 100 µL de la solución bloqueadora en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que para la adición de TMB. Se mezcló con agitación suave. En los conjugado del anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG humana con la enzima peroxidasa pozos con anticuerpos positivos el color azul cambió a amarillo.
11. Se leyó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia de 600 nm, antes de 30 min.

Evaluación de los resultados de la técnica de ELISA IgG vs VD:

5. Se calculó la media de la absorbancia de los triplicados del calibrador. Este fue el valor del punto de corte.
6. El valor de índice se calculó dividiendo la absorbancia de la muestra entre el valor del punto de corte (calculado en el paso anterior).
7. Las unidades PANBIO se calcularon multiplicando por 10 el valor de índice (calculado en el paso 2).
Valor de índice = Absorbancia de la muestra / Valor del punto de corte
Unidades PANBIO = Valor de índice X 10
8. Se realizó la interpretación de resultados (Tabla 5).

V.2.4.5 Pruebas de PNRP

La prueba de PNRP se utilizó para confirmar las muestras de suero positivas para anticuerpos IgG anti-VON. Esta prueba permite identificar anticuerpos neutralizantes en contra de diferentes especies de flavivirus y así diferenciar falsos positivos debidos a reactividad cruzada. Para realizar los ensayos de PNRP es indispensable el manejo de cultivo viral en un laboratorio de tercer nivel. El Dr. Bradley J. Blitvich del Departamento de Microbiología Veterinaria y Medicina Preventiva del Colegio de Medicina Veterinaria en el Estado de Iowa, EUA colaboró en este proyecto realizando estos ensayos en su laboratorio.

En los ensayos de PNRP se incluyeron 147 muestras de suero positivas para anticuerpos IgG del VON. Los ensayos de PNRP se realizaron utilizando las siguientes cepas de flavivirus: VON (cepa NY99-

35261-11), VESL (cepa TBH-28), DV-1 (cepa Hawaii), DV-2 (cepa NGC), DV-3 (cepa H-87) y DV-4 (cepa 241). Las cepas virales se obtuvieron del Centro de Referencia e Investigación de Arbovirus (Organización Mundial de la Salud) de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades en la División de Enfermedades Infecciosas transmitidas por Vectores. (Fort Collins, CO, EUA). Los ensayos de PNRP se realizaron en cultivos de células de riñón de mono verde (células Vero), con excepción del cultivo para DV-1 el cual se realizó en células de riñón de mono Rhesus (células MK). Las muestras de suero analizadas se analizaron en presencia de 8% de factor sérico lábil. (Chappell et al, 1971). Los sueros se probaron inicialmente a una dilución de 1:20. Aquellos sueros que reducían el número de placas en una proporción \geq al 70% fueron titulados para probarlos a mayores diluciones. Los valores de titulación se expresaron como diluciones recíprocas que reducían en un porcentaje \geq 90% (PNRP₉₀) el número de placas (PNRP₉₀). Para realizar el diagnóstico etiológico los títulos de anticuerpos PNRP₉₀ para un virus debería ser al menos 4 veces mayores que el título para los demás flavivirus analizados.

V.2.5 Pruebas de detección del genoma del VON

Se realizaron las pruebas de detección del genoma del VON a los grupos de estudio I y III. Las muestras del grupo II no fueron analizadas por estas técnicas ya que habían sido almacenadas varios días a 4°C en el Laboratorio estatal de la SSA antes de ser transportadas al laboratorio y no cumplían con los requisitos para prevenir la degradación del RNA. Para la detección del RNA del VON se utilizaron las técnicas de retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa anidada (RT-PCR_n) y PCR en tiempo real (qPCR). En las pruebas de RT-PCR anidada se emplearon dos juegos de oligonucleótidos que amplifican una región que incluye fragmentos de las proteínas C y Pre M. En los ensayos de qPCR se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos con sondas Taq Man que amplificaron las regiones de la proteína E y la región 3'UTR). Adicionalmente se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos que flanqueaban las regiones amplificadas en la qPCR.

V.2.5.1 Extracción de RNA total

Se realizaron extracciones de RNA a partir de suero y de LCR. La extracción de RNA total se realizó con el reactivo TRIzol®. El reactivo de TRIZOL es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. El método utilizado es una modificación del método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987) para extracción de RNA en un solo paso. El RNA obtenido se precipitó con isopropanol grado analítico y glucógeno (10 µg/mL), obteniéndose una pastilla la cual se

lavó con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC), se precipita con etanol al 100% y se resuspende en agua tratada con DEPC.

Protocolo:

1. Se colocaron 400 μ L de plasma o LCR en un microtubo de 2.0 mL.
2. Posteriormente se agregaron 600 μ L de TRIzol® frío, se mezcló por inversión y vórtex a baja velocidad hasta homogenizar completamente y se incubó por 5 min en hielo.
3. Después se agregaron 200 μ L de cloroformo, se agitó por inversión suavemente e incubó en hielo durante 5 m.
4. Se centrifugó la mezcla 8,000 rpm durante 5 min a 4°C.
5. Se transfirió la fase acuosa a un microtubo de 1.5 mL (cuidando de no contaminar con la fase orgánica).
6. Al microtubo con la fase acuosa se le agregaron 600 μ L de isopropanol y 10 μ L de glucógeno para precipitar el RNA total, se mezcló suavemente por inversión y se dejó reposar una hora o toda la noche a baja temperatura (-80°C).
7. Se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 4°C.
8. Posteriormente se decantó el sobrenadante y resuspendió el precipitado de RNA en 50 μ L de agua DEPC.
9. Luego se repitió la precipitación del RNA utilizando 150 μ L de etanol al 100 %
10. Se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 4°C.
11. Finalmente se resuspendió el precipitado en 20 μ L de agua tratada con DEPC.

Nota: Todos los reactivos se mantuvieron en hielo durante la extracción del RNA total y las muestras se guardaron en congelación a -80°C.

V.2.5.2 Diseño de oligonucleótidos y sondas Taq Man

Para realizar el diseño de oligonucleótidos y sondas Taq Man se realizó una búsqueda de secuencias en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2008) y se eligieron 23 secuencias nucleotídicas del genoma del VON. En el análisis se incluyeron 6 cepas del VON aisladas en Texas, EUA, la cepa NY 1999, 6 cepas asiladas por el CDC en EUA, cepas aisladas en los estados de N.L. y Tabasco en México, entre otras (Anexo 4). La mayoría de las secuencias incluidas para este análisis (n=19) pertenecen a cepas aisladas en el continente Americano.

Posteriormente las secuencias fueron analizadas en el programa ClustalW2 (EMBL-EBI, 2008). Se escogieron la región no codificante 3'UTR y la región codificante de la proteína E del genoma viral. Para el diseño de los oligonucleótidos y la sonda Taq Man se utilizó el programa Primer Express 2.0. Se realizó el diseño de los oligonucleótidos y de las Sonda Taq Man para la región 3'UTR (Oligonucleótidos UTR-U y UTR-D) y la región codificante para la proteína E (Oligonucleótidos PE-U y PE-D) del genoma del VON (Figura 15).

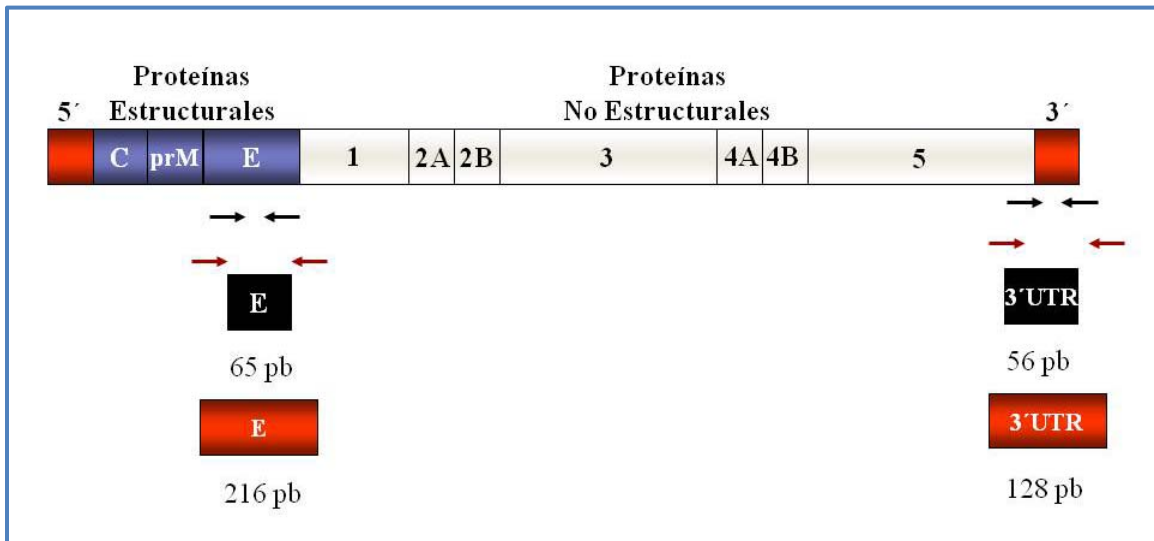


Figura 15. Estructura del genoma del VON. Las flechas y bloques en color negro indican las regiones del genoma del VON amplificadas para los ensayos de qPCR. Las flechas y bloques rojos indican las regiones amplificadas para el diseño de los plásmidos utilizados para los ensayos de sensibilidad de las reacciones de qPCR.

V.2.5.3 Reacción de amplificación por medio de qPCR

Los ensayos de qPCR se realizaron a partir del RNA total, se buscó la presencia del RNA del VON mediante amplificación por medio de RT-PCR en tiempo real en un solo paso utilizando la enzima Multiscribe One-Step Master Mix. Todas las sondas contenían el reportero 5' FAM (6-carboxifluoresceína) y el apagador TAMRA (6-carboxi-N,N,N'N'-tetrametilrodamina).

Un juego de oligonucleótidos y sonda se utilizó para amplificar la región codificante de la proteína E (Oligonucleótidos PE-U y PE-D y el segundo juego amplificó la región 3'UTR (Oligonucleótidos UTR-U y UTR-D) del genoma del VON (Tabla 7). Las muestras de RNA fueron calentadas a 60°C durante 3 min antes de añadirse a la mezcla de reacción. Para cada reacción se agregaron: 12.5 µL de Taq Man Universal PCR Master Mix, 0.625 µL de la Enzima Multiscribe-RNAsin 40X, 1.25 µL de la

mezcla de oligonucleótidos y sonda Taq Man 20X y 7.625 μ L de agua libre de RNAsa (Tabla 8). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: Un paso inicial a 48°C por 30 min para llevar a cabo la reacción de RT, después 95°C por 10 min para activar a la enzima Taq Polimerasa, siguieron 40 ciclos de 95°C por 15 s y 60°C por 60 s. La fluorescencia fue detectada en cada ciclo de PCR en el paso de alineamiento y se generaron las curvas de amplificación.

Tabla 7. Oligonucleótidos y sondas utilizadas en las reacciones de qPCR.

INICIADOR	POSICIÓN EN EL GENOMA DEL VON	SECUENCIA (5'-3')
UTR-U	10,628-10,647	GAAGGAGGACCCACATGTT
UTR-D	10,666-10,683	GCCGTAGCGTGGTCTGA
UTR sonda	10,648-10,665	FAM-ATTGGGCTTTGAAGTTAC-TAMRA
PE-U	1999-1221	GAGAAGCTCACAATGACAAACGT
PE-D	1245-1263	CCTGTCCACCACTCCTTGT
PE sonda	1223-1237	FAM-CTGACCCAGCTTTTG-TAMRA

Tabla 8. Reacción de qPCR para amplificar las regiones 3'UTR y la proteína E del VON.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN
Taq Man Universal PCR Master Mix	2X	12.5 μ L
Enzima Multiscribe-RNAsin	40X	0.625 μ L
Mix de Oligonucleótidos y sonda Taq Man 20X	20X	1.25 μ L
Agua libre de RNAsas		7.625 μ L
RNA viral		3 μ L
Volumen Final		25 μL

En cada reacción de PCR se incluyeron testigos negativos (de agua y de reactivos, sin RNA), así como testigos positivos (RNA-VON). El RNA testigo positivo fue donado a nuestro laboratorio por el Dr.

José A. Farfán de la Universidad Autónoma de Yucatán. Los testigos negativo y positivo se analizaron por duplicado y se repitió el experimento por triplicado.

V.2.5.4 Ensayos de especificidad para la qPCR

Para los ensayos de especificidad se extrajeron RNAs de otros dos *flavivirus* (Virus de la Hepatitis C y VD) por medio de la técnica de TRIZOL descrita anteriormente (4.2.5.1 Extracción de RNA total). Las muestras se analizaron por qPCR por triplicado utilizando los dos juegos de oligonucleótidos y sondas diseñados, como se describió en el punto anterior.

V.2.5.5 Ensayos de sensibilidad para qPCR

Para realizar los ensayos de sensibilidad se construyeron dos plásmidos con las secuencias de la proteína E y la región 3'UTR del VON. Las clonas fueron cuantificadas y se realizaron diluciones desde 300,000 hasta 3 copias para analizar la sensibilidad de los ensayos de qPCR.

V.2.5.5.1 Clonación y análisis de los PA

Para realizar los ensayos de sensibilidad se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos que flanquean las regiones amplificadas por qPCR (Proteína E y región 3'UTR). Los oligonucleótidos que amplifican a la proteína E generan un fragmento de 216 pb y los correspondientes a la región 3'UTR generan un fragmento de 126 pb (Figura 15 y Tabla 9). Los PA se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones 3'UTR y proteína E del genoma del VON.

INICIADOR	POSICIÓN EN EL GENOMA DEL VON	SECUENCIA (5' - 3')
Plásmido PE-U	1090-10111	GAT GTG AAG ATG ATG AAT ATG G
Plásmido PE-D	1285-1305	AAT GCT TCC TTT ACC AAA TAG'
Plásmido UTR-U	10,594-10,613	GAA GTG ATC CAT GTA AGC CC
Plásmido UTR-D	10,700-10,719	GCA CTA TCG CAG ACT GCA CT

Los productos amplificados (PA) fueron purificados utilizando el estuche Wizard SV Gel and PCR Clean Up (Anexo 5) y clonados en el vector T pCR-XL-TOPO 3.5. Se utilizaron las células electrocompetentes de *E. coli* Top 10. La técnica utilizada para la clonación de los PA fue la del vector T (Marchuk D, 1990),

Los productos de PCR y el vector T se sometieron a ligación en un volumen final de 3 μ L. Se utilizaron 2 μ L de los PA de las dos regiones amplificadas. Se agregaron 0.5 μ L de la mezcla del Vector T y la enzima ligasa. Se incubó la mezcla 5 min a temperatura ambiente y se agregaron 0.5 μ L de la solución bloqueadora. Después se agregaron 100 μ L de bacterias electrocompetentes y se realizó la electroporación. Se inocularon 4 mL de medio LB (bactotripton 1%, extracto de levaduras 0.5%, NaCl al 1% y kanamicina 0.1 μ g/ml), con 100 μ l de bacterias *E. coli* Top 10 y se dejaron crecer toda la noche.

Para seleccionar las clonas portadoras se tomó del medio de cultivo LB y se sembró en placas, las cuales se dejaron incubar por 16 h. Se eligieron 9 colonias para la región 3'UTR y 8 colonias de la región codificante de la proteína E. Cada colonia de bacterias se creció en 3 mL de medio LB con kanamicina (0.1 μ g/mL) y se mantuvo con agitación vigorosa de 250 rpm durante la noche. Para la extracción de DNA plasmídico se utilizó el método de lisis alcalina (Sambrook J, 2001). Al día siguiente se centrifugaron 1.5 mL del medio de cultivo durante 30 seg a máxima velocidad (14, 000 rpm) y se removió el medio del tubo manteniéndolo en hielo. La pastilla resultante se resuspendió en 100 μ l de solución I (glucosa 50mM, Tris-Cl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, pH 8) utilizando el vórtex. Se agregaron 200 μ l de solución II (0.2 mL de NaOH 10 N, 1.0 mL de SDS 10% y 8.8 mL de agua) recién preparada (8.8 mL de agua + 0.2 mL de NaOH 10 N + 1 mL de SDS 10%), la solución se mezcló rápidamente por inversión (5 veces), y se incubó 5 min en hielo.

Se agregaron 150 μ L de solución III fría, el tubo se agitó en el vórtex y se incubó en hielo 5 m. Se centrifugó durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El DNA plasmídico se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo (1:1), aproximadamente 190 μ L de cada uno, mezclando al vórtex 1 m. Después de centrifugar 2 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se precipitó el DNA plasmídico con 2 volúmenes de etanol (95-100%) a temperatura ambiente, mezclando al vórtex y dejando reposar 2 m. Se centrifugó a 12,000 g por 5 min a 4°C. Se removió completamente el sobrenadante por aspiración y se dejó el tubo invertido sobre una toalla de papel. Se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70% frío y se centrifugó medio m. Se removió el etanol y se dejó secar la pastilla

al aire por 10 m. Por último el DNA plasmídico se disolvió en 50 µL de TE con RNAsa pancreática (20 µg/mL).

V.2.5.5.2 Análisis de clonas recombinantes

Los DNAs plasmídicos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %. Las clonas se amplificaron con los oligonucleótidos específicos para las regiones 3'UTR y proteína E. Las clonas que dieron el PA del tamaño esperado fueron purificadas en mediana escala utilizando el estuche comercial Plasmid Midi Kit de QUIAGEN (Anexo 6), se siguieron las recomendaciones del proveedor. Las clonas purificadas fueron secuenciadas.

V.2.5.5.3 Determinación de las secuencias nucleotídicas

La secuencia de las clonas se determinó por secuenciación cíclica con una adaptación de terminación en cadena (Sanger y Nicklen., 1977). Para realizar la secuenciación se utilizó el estuche comercial BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit. Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron los oligonucleótidos específicos de la región 3'UTR y de la proteína E del VON. Se utilizaron 20 ng de las clonas a amplificar en un volumen de reacción de 20 µL (Tabla 10). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: Un paso inicial a 96°C por 1 m, después siguieron 25 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s y 60°C por 4 m.

Tabla 10. Reacción de PCR para secuenciación de las regiones 3'UTR y proteína E del genoma del VON.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN
Ready Reaction Premix	2.5X	4 µL
Amortiguador Big Dye Sequencing	5X	2 µL
DNA plasmídico	20 ng	5 µL
Agua		9 µL
Volumen Final		20 µL

V.2.5.5.4 Análisis de las secuencias nucleotídicas

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas fueron ensambladas en el programa en línea CAP 3 (Pôle-Bioinformatique-Lyonnais, 2008). Las secuencias se compararon en Internet mediante el programa BLAST con las secuencias reportadas en el GenBank (EMBL-EBI, 2008)(Anexo 7).

V.2.5.5.5 Determinación de los límites de sensibilidad de los ensayos de qPCR

Para la evaluación de la sensibilidad de los ensayos de qPCR se utilizaron clonas purificadas de las regiones 3'UTR y de la proteína E del VON. Se realizaron diluciones en múltiplos de 10 desde 300,000 hasta 3 copias. A continuación se describen los cálculos realizados para la determinación del número de copias por reacción de PCR.

- A) Se determinó del Peso Molecular (PM) de cada plásmido
$$X \text{ Daltons} = (\text{tamaño del plásmido en pb})(330 \text{ daltons} \times 2 \text{ nt/bp})$$
$$\text{Daltons} = \text{g/mol}$$
- B) Se realizó la conversión del PM a número de copias
$$X \text{ g/molécula} = X \text{ g/mol} / \text{No de Avogadro} (6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol})$$
$$X = \text{peso de una molécula o peso de una copia del plásmido}$$
- C) Se calculó los pg de DNA para la curva de 300,000 a 3 copias.
- D) $\text{pgDNA} = (\text{Número de copias}) (\text{masa de una copia del plásmido})$ Se calculó la concentración de DNA plasmídico (pg) necesario para agregar X número de copias en un volumen de 5 μL a la reacción de qPCR. Se dividieron las masas calculadas en el paso C entre los 5 μL pipeteadas para cada reacción.
- E) Se determinó la concentración final ($\text{pg}/\mu\text{L}$) = $\text{pgDNA} / 5$ Se procedió a hacer los cálculos para diluir los stocks de plásmidos purificado y obtener una concentración de 300,000 copias/5 μL .
- F) Se utilizó la fórmula $C_1V_1 = C_2 V_2$ Una vez obtenida la dilución de 300,000 copias se realizaron diluciones seriadas en múltiplos de 10 hasta obtener la dilución de 3 copias.
- G) Una vez obtenidas las diluciones se analizaron por medio de qPCR 5 μL de cada plásmido con las mismas condiciones mencionadas en la sección 4.2.5.3.

Los ensayos para determinar los límites de cuantificación se realizaron tanto para las reacciones de PCR convencional como para las de qPCR. Se realizó una curva de rango dinámico desde 300,000 hasta 3 copias por mL.

V.2.5.6 Ensayos de RT-PCR cualitativa

Para realizar el diagnóstico molecular del genoma del VON por medio de RT-PCRn se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos (Lanciotti et all, 2000; Shi et all, 2001), los cuales amplifican una región que incluye fragmentos de la proteína C y la proteína preM del VON.

V.2.5.6.1 Reacción de RT.

Los DNA complementarios (DNACs) se sintetizaron a partir de RNA total (RNAt) utilizando hexámeros aleatorios. Se utilizaron reactivos de Invitrogene para preparar la reacción de RT (Tabla 11).

Tabla 11.- Condiciones de reacción utilizadas para la síntesis del DNAC a partir de RNA viral.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
RNA viral	5µL
Hexámeros aleatorios	2.5µM
Agua miliQ	cbp12µl
<i>La reacción se incubó 10 min a 70°C, el tubo se centrifugó 3 segundos y se agregaron los siguientes reactivos:</i>	
Amortiguador 5X de primera cadena1X	
DTT 0.1M	0.01M
dNTP's 10 mM	0.5Mm
<i>La reacción se incubó 2 min a 42°C</i>	
SuperScript II (200U/µl)	200 U
<i>La reacción se incubó a: 10 min a 25°C, 50 min a 42°C y 15 min a 70°C.</i>	

V.2.5.6.2 Reacción de PCR anidada (PCRn).

Una vez sintetizados los DNAC, se realizó la PCR utilizando los oligonucleótidos VON-1 y VON-2, posteriormente se realizó la PCRn con los oligonucleótidos VONn-3 y VONn-4 (Tabla 12). Los

oligonucleótidos para la primera PCR generan un fragmento de 408 pb y el juego de oligonucleótidos del PCRn genera un fragmento de 193 pb. Las condiciones de reacción se describen más adelante (Tabla 13).

Tabla 12. Secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos utilizados en la PCRn. Los oligonucleótidos amplifican las regiones de la proteína C y de la proteína preM del genoma del VON.

INICIADOR	POSICIÓN EN EL GENOMA DEL VON	SECUENCIA (5' - 3')
VON-1	233-257	TTGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTT
VON-1	640-616	CAGCCGACAGCACTGGACATTCATA
VONn-3	287-308	CAGTGCTGGATCGATGGAGAGG
VONn-4	370-390	CCGCCGATTGATAGCACTGGT

Tabla 13. Condiciones de reacción de la PCRn. Se estandarizaron las condiciones para amplificar la región de la proteína C y proteína preM del genoma del VON.

PCR 1	
Concentración inicial	Concentración Final
Amortiguador 10 X	1X
MgCl₂ 50mM	2.5 mM
dNTP's 10 mM	0.4 mM
Oligonucleótido VON-1 10 μM	0.6 μM
Oligonucleótido VON-2 10 μM	0.6 μM
TaqDNAPolimerasa 5u/μl	2.5 U/μl
DNAc	5 μl
Agua Mili Q	
Volumen Final de Reacción	50 μl
PCR anidada	
Concentración inicial	Concentración Final
Amortiguador 10 X	1X
MgCl₂ 50mM	1.5 mM
dNTP's 10 mM	0.2 mM
Oligonucleótido VON-3 10 μM	0.3 μM
Oligonucleótido VON-4 10 μM	0.3 μM
TaqDNAPolimerasa 5u/μl	1.25 U/μl
PA PCR 1	1 μl
Agua Mili Q	
Volumen Final de Reacción	50 μl

Después de un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 m, las amplificaciones se llevaron a cabo durante 35 ciclos. Aunque se utilizó el mismo programa para todas las amplificaciones, la temperatura de alineamiento (T_m) fue específica para cada juego de oligonucleótidos; las temperaturas utilizadas para la PCR 1 fueron de 56°C y 52°C para la PCRn. Los ciclos consistieron en un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 45 s, un segundo paso de apareamiento a la T_m de cada juego de

oligonucleótidos durante 45 s y un tercer paso de extensión a 72°C durante 1 m. Al finalizar los 35 ciclos, se llevó a cabo un paso de extensión a 72°C durante 10 m.

Una vez obtenidos los PA, éstos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Los geles se prepararon con TBE 0.5X (Tris-borato 0.089 M. ácido bórico 0.089M). El gel solidificado se colocó en una cámara de electroforesis, la cual contenía el mismo amortiguador. Las muestras se mezclaron con jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25 %, xilencianol al 0.25 % y glicerol al 30%) y fueron depositadas en el gel. La electroforesis se corrió a 95 V y una vez terminada, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 5 a 10 m, se lavó con agua y se procedió a observarlo en el fotodocumentador.

V.3 Análisis estadístico

En este estudio se realizó estadística descriptiva. La prueba de chi-cuadrada (X^2) o exacta de Fisher fueron utilizadas para comparar las variables categóricas. Se consideró estadísticamente significativo si el valor de $P < 0.05$. Se emplearon los programas Epi Info versión 3.3.2 y el SPSS versión 13.0.

VI. RESULTADOS

VI.1 Sujetos de estudio

En este estudio se incluyeron un total de 1,432 sujetos divididos en tres grupos de estudio, los cuales se describieron en la sección de material y métodos. De cada individuo se recolectaron datos epidemiológicos y de riesgo para adquirir una infección por picaduras de mosquitos. Se incluyeron 867 hombres (61%) y 565 mujeres (39%). Todos los participantes provenían del noreste de México. La mayoría provenían del estado de Nuevo León y el resto provenía de los estados de Coahuila y Tamaulipas. (Tabla 14).

Tabla 14. Características clínicas y demográficas de los sujetos de estudio

Características demográficas	Grupos de Estudio			
	Grupo I Controles sanos	Grupo II Pacientes Febriles	Grupo III Pacientes Neurológicos	Total
No. participantes	588	44	800	1432
No. hombres	182	27	658	854
No. mujeres	406	17	142	534
Proporción Hombre/mujer	1 : 2.2	1 : 0.6	1 : 0.2	1 : 0.6
Promedio de edad (años)	1 – 73	1 – 79	18 – 60	1 – 79
Media de la Edad	28	33	32	31
Estado:				
Nuevo León	588	43	767	1398
Coahuila	0	0	8	8
Tamaulipas	0	1	25	26

VI.2 Pruebas serológicas

VI.2.1 Detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG anti-VON por ELISA

Todos los participantes del estudio fueron analizados para la detección de anticuerpos del tipo IgM anti-VON y ninguno fue positivo para esta prueba. Este resultado nos indica que ninguno de los

pacientes analizados estaba cursando con una infección reciente por el VON. Para la detección de anticuerpos del tipo IgG se analizaron 332 muestras, de las cuales se obtuvieron 162 muestras positivas. Se encontró evidencia serológica de anticuerpos IgG-VON en 21(50%) de 42 muestras analizadas de donadores de sangre. En el grupo de pacientes febriles encontramos 127 (51.2 %) muestras positivas de 248 analizadas y en el grupo de pacientes neurológicos se detectaron 14 (33%) muestras positivas de 42 analizadas. Del 33 al 51% de las muestras que se analizaron fueron positivas tanto para anticuerpos IgG-VON como para anticuerpos IgG-VD (Tabla 15). Debido a la reactividad cruzada de la técnica de ELISA IgG, las muestras positivas para IgG-VON se analizaron por medio de PNRP para confirmar los resultados.

VI.2.2 Detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG anti-VD por ELISA

En el grupos de sujetos donadores de sangre se detectaron 16 (2%) sujetos positivos para anticuerpos IgM-VD. En el grupo de paciente febriles se detectaron 44 (7.5%) sujetos positivos para IgM-VD de 588 analizados. Todos los pacientes febriles positivos para IgM del VD fueron también positivos al realizar la detección de anticuerpos IgG del VD. En el grupo de pacientes neurológicos no se detectaron sujetos positivos para anticuerpos IgM-VD. En el grupo de pacientes febriles 142 (67.6 %) sueros de pacientes de 210 analizados fueron positivos para anticuerpos IgG-VD. En los pacientes neurológicos se detectaron 17 (59%) IgG-VD positivos de un total de 29 sueros analizados (Tabla 15). En los tres grupos de estudio los sujetos positivos para anticuerpos IgG-VON fueron también positivos para anticuerpos IgG-VD.

Tabla 15. Detección de anticuerpos del tipo IgG e IgM anti-VON y anti-VD en los grupos estudiados.

Prueba Serológica	Grupo de Estudio		
	Individuos positivos/Individuos analizados (%)		
	Grupo I Controles sanos	Grupo II Pacientes Febriles	Grupo III Pacientes Neurológicos
Anticuerpos IgM-VON	0 / 800 (0%)	0 / 588 (0%)	0 / 44 (0%)
Anticuerpos IgG-VON	21 / 42 (50 %)	127 / 248 (51.2%)	14 / 42 (33.3%)
Anticuerpos IgM-VD	16 / 800 (2.0%)	44 / 588 (7.5%)	0 / 44 (0%)
Anticuerpos IgG-VD	80 / 135 (59.2 %)	142 / 210 (67.6 %)	17 / 29 (58.6 %)

VI.2.3 Detección de anticuerpos neutralizantes por medio de PNRP

Las muestras positivas para IgG del VON fueron analizadas por medio de la técnica confirmatoria de PNRP para detectar anticuerpos neutralizantes en anti-VON, el VESL y los cuatro serotipos del VD. Aunque originalmente se detectaron 162 muestras IgG anti-VON positivas por ELISA, no fue posible analizarlas todas debido a que 14 muestras correspondieron a muestras del laboratorio estatal y se encontraban en mal estado. Se analizaron un total de 147 muestras IgG positivas de las cuales 21 correspondían a donadores de sangre, 112 a pacientes con fiebre y 14 a pacientes neurológicos (Anexo 8). Seis individuos fueron positivos para el VON por PNRP, dos de ellos eran donadores de sangre y cuatro pacientes febriles. Todos los sujetos positivos para el VON eran procedentes de Nuevo León y no tenían antecedentes de viajes fuera de la región en los últimos dos meses antes de haber ingresado al protocolo (Tabla 16 y 17). La seroprevalencia del VON en la población estudiada fue de 1.8 %.

Se detectaron además 64 individuos seropositivos para el VD-1, de los cuales 44 eran sujetos febriles, 9 eran pacientes neurológicos y 11 donadores asintomáticos. La seroprevalencia del VD-1 en la población estudiada fue del 41%. Para el VD-2 se detectaron 23 individuos positivos de los cuales 20 fueron pacientes febriles, 1 paciente neurológico y 2 donadores de sangre. La seroprevalencia del VD-2 en la población estudiada para esta prueba fue de 15.6% (Tabla 16).

Además 24 individuos dieron un resultado seropositivo indeterminado para el VD. En este caso los títulos de anticuerpos detectados por PNRP₉₀ para un serotipo del VD no eran mayores de 4 veces que otro serotipo del VD. En 24 individuos se detectó una infección secundaria por VD en donde los títulos para dos o más serotipos del VD estaban elevados y eran similares. En 8 individuos no se detectaron anticuerpos para ninguno de los flavivirus analizados. Ninguna de las muestras analizadas fue positiva para los virus VD-3, VD-4 ni VESL.

Tabla 16. Resumen de los resultados de las pruebas de PNRP. Las muestras que fueron positivas para anticuerpos del tipo IgG anti-VON fueron confirmadas por medio de la prueba de PNRP.

Diagnóstico por PNRP	Grupos de Estudio (n=147)			
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Total
VON	2	4	0	6 (4%)
VESL	0	0	0	0
VD-1	11	44	9	64 (43.5%)
VD-2	2	20	1	23 (15.6%)
VD-3	0	0	0	0
VD-4	0	0	0	0
VD (serotipo indeterminado)	5	16	3	24 (16%)
Infección secundaria con flavivirus	0	22	0	22 (14.9%)
Negativos	1	6	1	8 (5.4%)

Tabla 17. Características de los participantes del estudio seropositivos para el VON por medio de las pruebas de PNRP.

Participante	Características Demográficas			
	Edad	Sexo	Estado de Residencia	Historia reciente de viajes*
Donador de Sangre	43	M	Nuevo Leon	NO
Donador de Sangre	19	M	Nuevo Leon	NO
Paciente febril	41	F	Nuevo Leon	NO
Paciente febril	45	M	Nuevo Leon	NO
Paciente febril	26	M	Nuevo Leon	NO
Paciente febril	38	M	Nuevo Leon	NO

* Historia de viajes en los dos meses anteriores de haber ingresado al protocolo.

VI.2.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para comparar los sujetos con exposición previa a flavivirus (positivos para anticuerpos IgG anti-VON y/o el VD) y los intervalos de edad, sexo y procedencia. También se realizó un análisis en donde se compararon los sujetos positivos para anticuerpos neutralizantes anti-VON y las variables sexo, edad y procedencia.

Al comparar los sujetos con exposición previa a flavivirus contra el género, se encontró que el género femenino tiene 1.85 veces más riesgo a una infección por *flavivirus* que el género masculino. El riesgo puede ser desde 1.19 hasta 2.88 (Razón de Momios (RM) = 1.85, IC 95% 1.19-2.88; ** $P=0.006$) (Tabla 18 y Figura 16).

Tabla 18: Comparación de lo sujetos IgG-VON e IgG-VD positivos y el género. Se encontró diferencia significativa entre los géneros masculino y femenino.

Género	IgG positivos n (%)	Valor de P
Femenino	130 (55.8)	0.006**
Masculino	103 (44.2)	

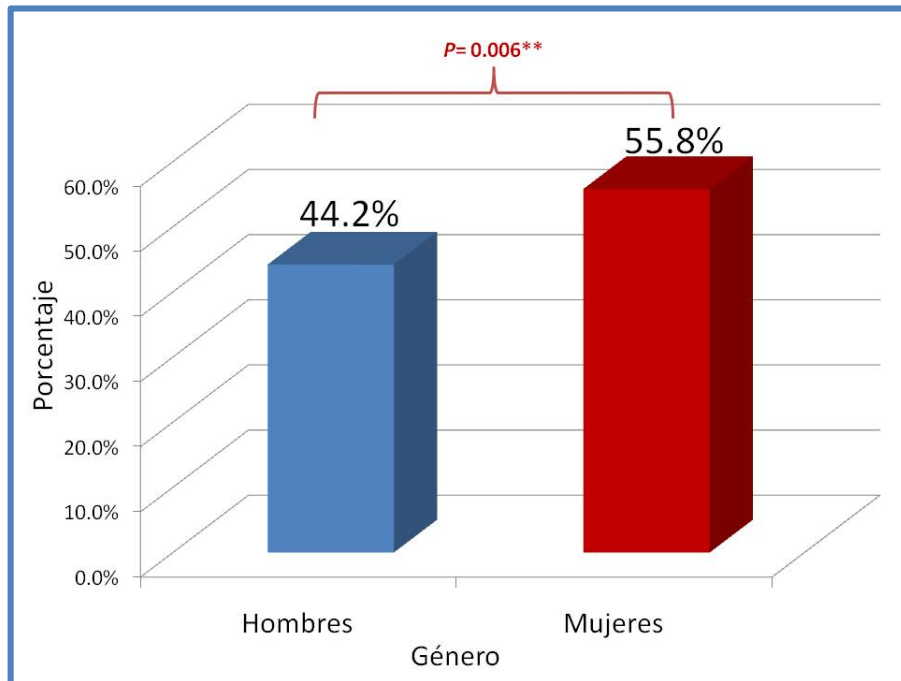


Figura 16: Comparación de lo sujetos IgG-VON e IgG-VD positivos y el género. Se encontró que el género femenino tiene 1.85 veces más riesgo a una infección por *flavivirus* que el género masculino.

Al realizar la comparación de sujetos con exposición a *flavivirus* contra los intervalos de edad se encontró que el valor de *P* fue significativo para el intervalo de edad < 10 años; debido a que la RM fue menor a 1 (RM= 0.124, IC 95% 0.034-0.448; ***P*=0.0001974). En éste grupo de edad la mayoría (80%) fue negativo para IgG VD. Todos los sujetos de entre 61 a 70 años de edad (100%) fueron positivos para IgG VD (***P*=0.008) (Tabla 19 y Figura 17).

Tabla 19: Comparación de lo sujetos IgG-VON e IgG-VD positivos y el intervalo de edad. Se encontró diferencia significativa entre los intervalos de 0 a 10 años y 61 a 70 años.

IgG positivos (n=233)	Rango Edad	P
	< 10 años	0.0001974**
	11-20 años	0.22
	21-30 años	0.4374
	31-40 años	0.6656
	41-50 años	0.12014
	51-60 años	0.6325
	61-70 años	0.008**
	71-80 años	0.3152

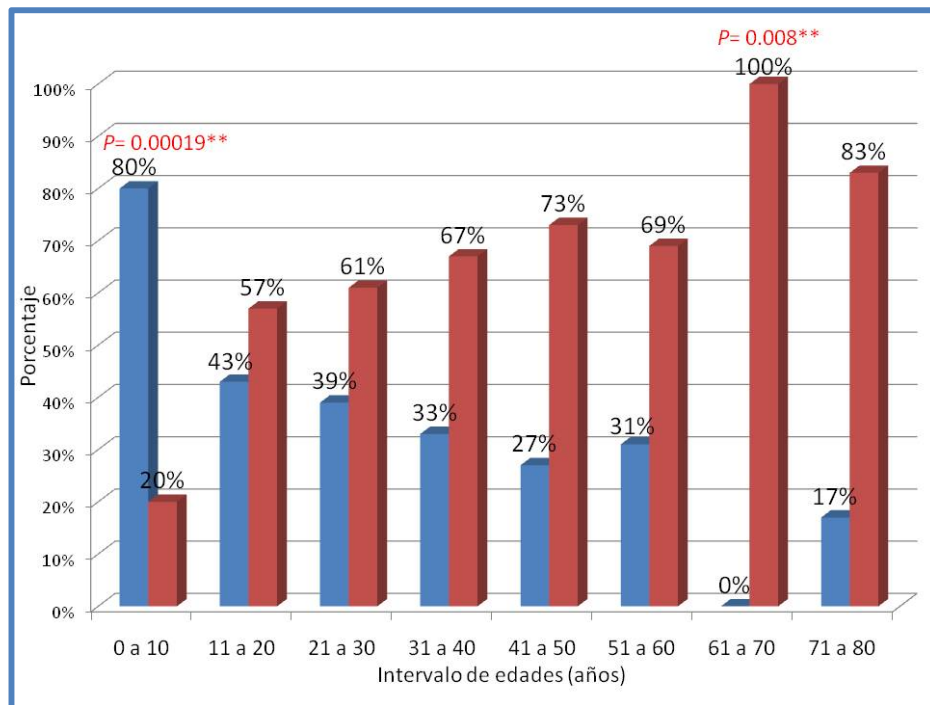


Figura 17. Resultados del análisis de comparación entre intervalos de edades y la exposición a flavivirus. Las barras azules muestran los sujetos negativos para las pruebas IgG anti-VON y VD y las barras rojas muestran los sujetos positivos para estos anticuerpos. En el intervalo de edad de 0 a 10 años el 80% de los sujetos fueron negativos para anticuerpos IgG anti-VD. Todos los sujetos de entre 61 a 70 años de edad (100%) fueron positivos para anticuerpos anti-IgG VD.

Al comparar los sujetos con exposición a *flavivirus* contra la procedencia, específicamente del estado de Nuevo León se encontró que aunque el valor de P fue significativo para los originarios de *Cerralvo*, la mayoría de los sujetos de este municipio (72.2%) fueron negativos para IgG VD (RM= 0.191, IC 95% 0.066-0.548; ** $P=0.001$). Lo mismo ocurrió con los sujetos del municipio de *Escobedo* en donde el valor de P fue significativo para los originarios de *Escobedo* en donde la mayoría de los sujetos de este municipio (66.7%) fueron negativos para IgG VD (RM= 0.251, IC 95% 0.092-0.686; * $P=0.04$).

Los residentes del municipio de *Guadalupe* tienen 2.69 veces más riesgo a una infección por *flavivirus* comparado con otros municipios. El riesgo puede ser desde 1.262 hasta 5.754 veces mayor (RM= 2.69, IC 95% 1.262-5.754; ** $P=0.008$). Los residentes del municipio de *Monterrey* tienen 1.705 veces más riesgo a una infección por *flavivirus* comparado con otros municipios. El riesgo puede ser desde 1.044 hasta 2.785 (RM= 1.705, IC 95% 1.044-2.785; * $P=0.032$).

Los residentes del municipio de *Santa Catarina* tienen 4.593 veces más riesgo a una infección por *flavivirus* comparado con otros municipios. El riesgo puede ser desde 1.039 hasta 20.306 (RM= 4.593, IC 95% 1.039-20.306; * $P=0.020$) (Tabla 20 y Figura 18).

Aunque los municipios de Apodaca, General Terán y San Nicolás de los Garza muestran una tendencia al riesgo de infección por *flavivirus*, no se obtuvo un valor de P significativo debido a que los números de muestras son pequeños.

Únicamente se analizaron los municipios que incluyeran un mínimo de 9 sujetos. Por lo que, la búsqueda de susceptibilidad a infección por *flavivirus* con otros municipios no es conveniente porque el tamaño de muestra es pequeño.

Tabla 20: Comparación de los sujetos IgG-VON e IgG-VD positivos (exposición a *flavivirus*) contra la procedencia (municipios del estado de NL).

IgG VD (n=307)	Municipio estado de NL	Número de muestras analizadas	Muestras positivas (%)	Valor de P
	Apodaca	15	11 (73)	0.3450
	Cerralvo	18	5 (27.8)	0.001**
	Linares	14	6 (43)	0.077
	Guadalupe	49	40 (81.6)	0.008**
	Monterrey	111	81 (73)	0.032**
	San Nicolás de los Garza	16	12 (75)	0.28
	San Pedro	10	4 (40)	0.2559
	Santa Catarina	18	16 (88.9)	0.020*
	General Terán	15	12 (80)	0.1652
	Santiago	9	3 (33.3)	0.052
	Escobedo	18	6 (33)	0.004*
	China (n=14)	14		0.077

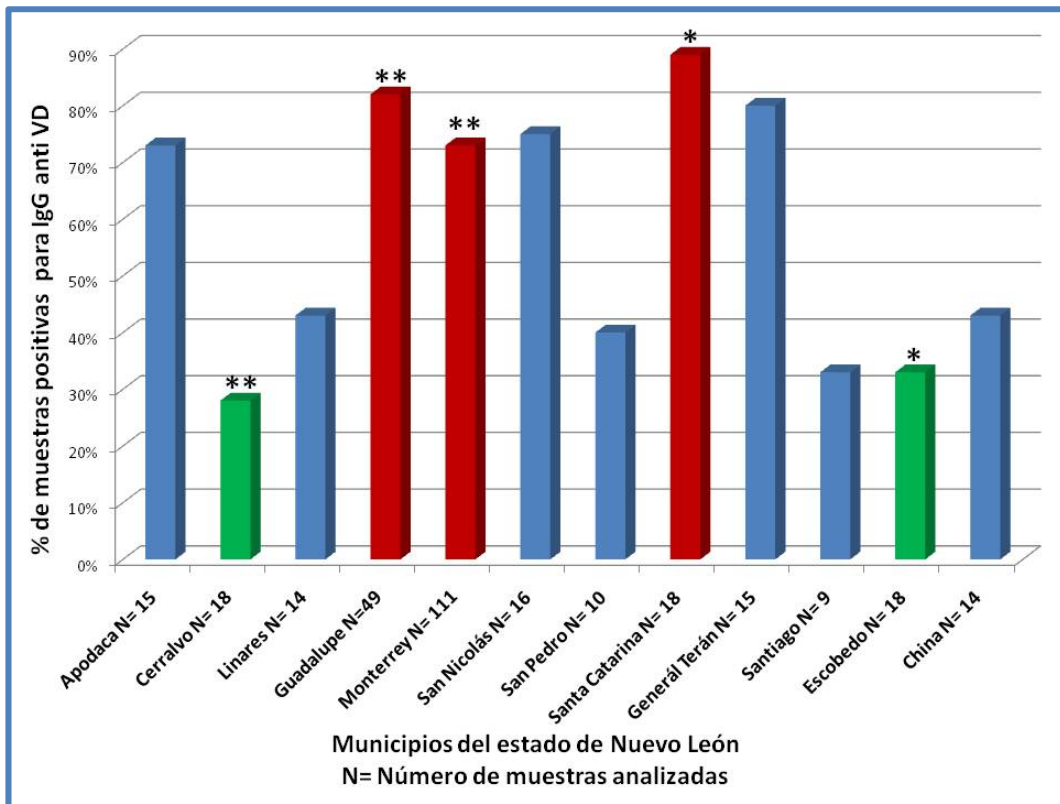


Figura 18. Comparación de sujetos con exposición a *flavivirus* contra la procedencia. Se señalan con un asterisco los municipios en los que se obtuvo un valor de P menor a 0.05 y con dos asteriscos los que obtuvieron un valor de P menor a 0.01. En rojo se encuentran los municipios que presentan mayor riesgo de una infección con *flavivirus* y en verde se señalan los municipios en los que el existe menor riesgo a una infección por *flavivirus* comparado con otros municipios.

Al comparar los sujetos positivos para anticuerpos neutralizantes anti-VON por medio de las pruebas de PNRP no se encontró asociación al compararlos con el género, edad o procedencia.

VI.3 Pruebas de detección del genoma del VON

Se realizaron las pruebas de detección del genoma del VON a un total de 800 sujetos del grupo de donadores y 44 pacientes neurológicos. Se realizaron las extracciones de RNA de todas las muestras y se conservaron a -80°C hasta realizar el análisis molecular.

VI.3.1 Reacción de amplificación por medio de qPCR

Se realizaron los ensayos de RT-PCR convencional y se obtuvieron los PA correspondientes. Una vez obtenidos, los PA fueron purificados y clonados. De las clonas positivas se eligieron 9 clonas de cada región y para verificar la inserción del fragmento se les realizó PCR con los oligonucleótidos correspondientes. Se obtuvieron los PA del tamaño esperado en las 9 clonas de la región codificante de

la proteína E. Para la región 3'UTR se obtuvo una colonia que generaba el PA del tamaño específico y 8 colonias más que presentaban bandas adicionales (Figura 19). Se eligió una clona para cada región y se procedió a purificar los DNAs plasmídicos. Las clonas se secuenciaron y las secuenciadas fueron comparadas en el banco de genes (NCBI). Una vez terminado el análisis de las secuencias se procedió a realizar los rangos dinámicos por qPCR.

Se analizaron las diluciones por PCR convencional obteniéndose límites de sensibilidad de 300 copias para ambos juegos de oligonucleótidos (Figura 20). En los ensayos de qPCR se obtuvieron líneas de amplificación en todas las diluciones, alcanzándose un límite de sensibilidad de 3 copias por reacción para ambas regiones amplificadas (Figuras 21 y 22). Una vez que se obtuvieron las líneas de amplificación se graficaron los valores del CT (ciclo de amplificación en fase logarítmica) y el número de copias para obtener los coeficientes de correlación (r). Para la región 3'UTR se obtuvo una r de 0.95 y para la región de la proteína E se obtuvo una r de 0.96 (Anexo 9) (Figuras 23 y 24).

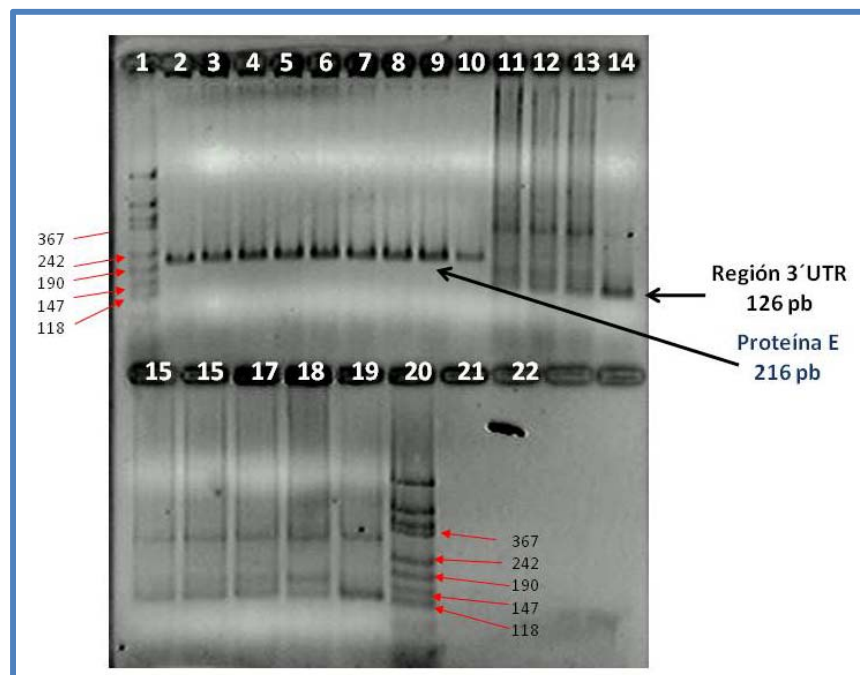


Figura 19. Electroferograma de los productos amplificados obtenidos de las regiones de la proteína E y la región 3'UTR por medio de PCRn. En los carriles 1 y 20 se muestra el marcador de tamaño molecular. Los carriles del 2 al 10 corresponden a los PA de las 9 clonas seleccionadas para la región de la proteína E y los carriles del 11 al 19 corresponden a los PA de las clonas de la región 3'UTR del VON. En los carriles 21 y 22 se muestran los testigos negativos de ambas reacciones.

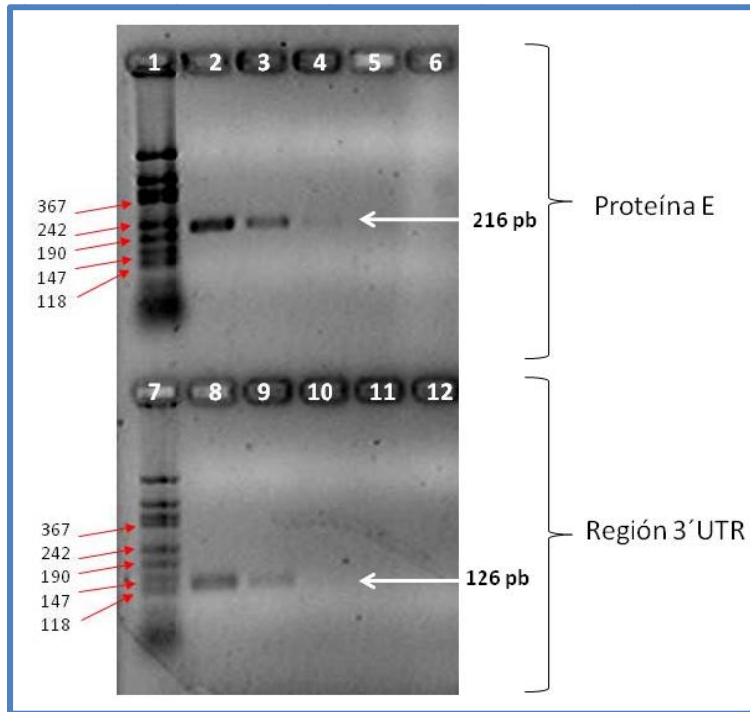


Figura 20. Electroferograma de productos de las regiones de la proteína E y 3' UTR. En la figura se muestra un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En los carriles 1 y 7 se muestra el marcador de tamaño molecular. Los carriles del 2 al 6 corresponden a las diluciones para la región de la proteína E y los carriles del 8 al 12 corresponden a los PA de las diluciones de las clonas de la región 3'UTR del VON.

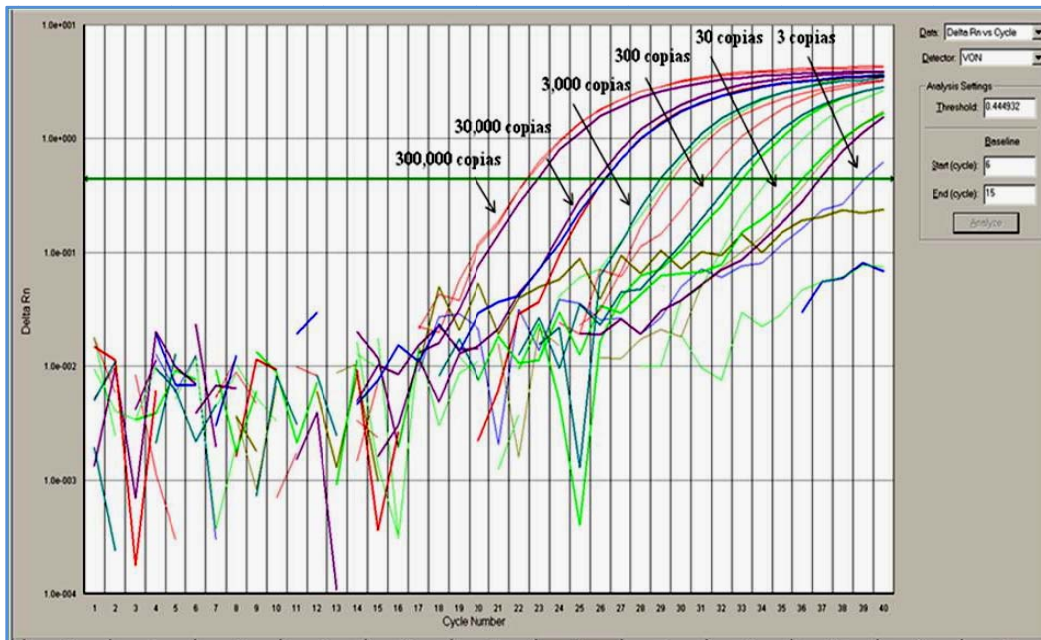


Figura 21. Amplificación de la región 3'UTR del genoma del VON por medio de PCR en tiempo real. Se observan las líneas de amplificación de las reacciones de 300,000, 30,000, 3,000, 300, 30 y 3 copias del plásmido por reacción.

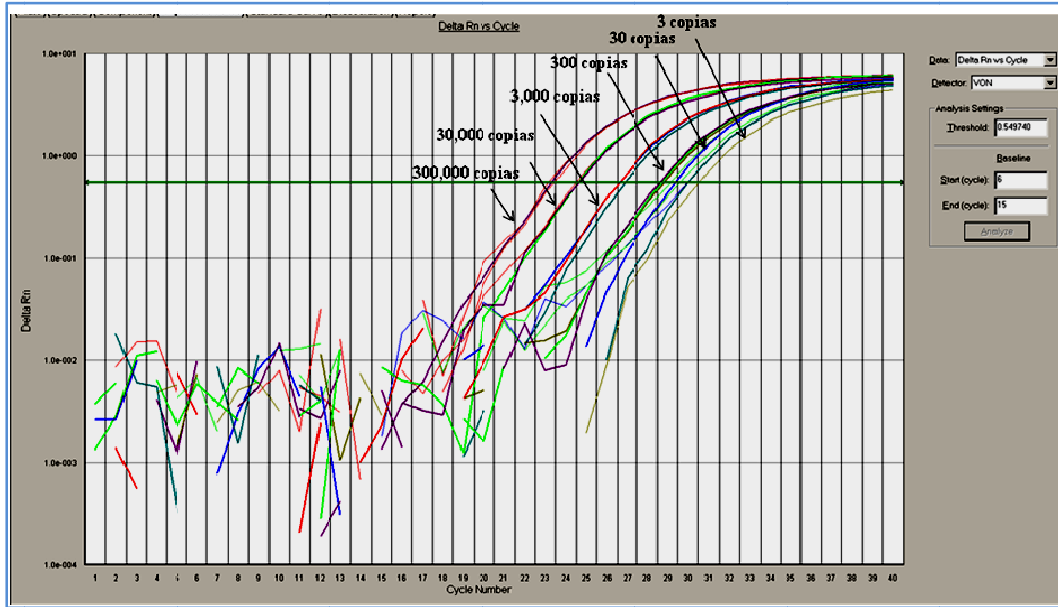


Figura 22. Amplificación de la región de la proteína E del genoma del VON por medio de PCR en tiempo real. Se observan las líneas de amplificación de las reacciones de 300,000, 30,000, 3,000, 300, 30 y 3 copias del plásmido por reacción.

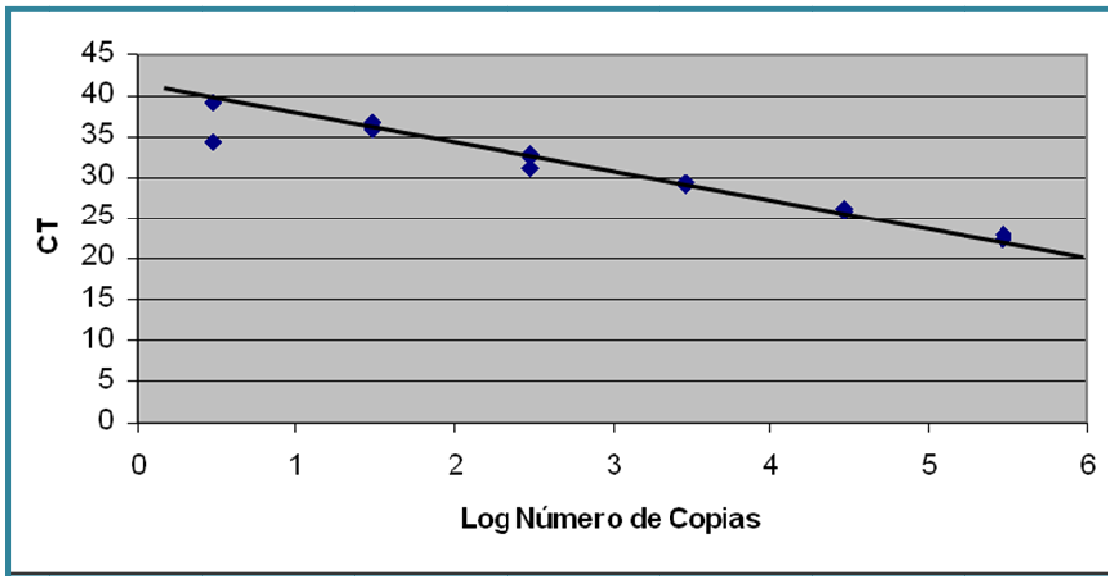


Figura 23. Grafica de los valores de CT con respecto al logaritmo del número de copias de la reacción que amplifica la región 3'UTR del genoma del VON.

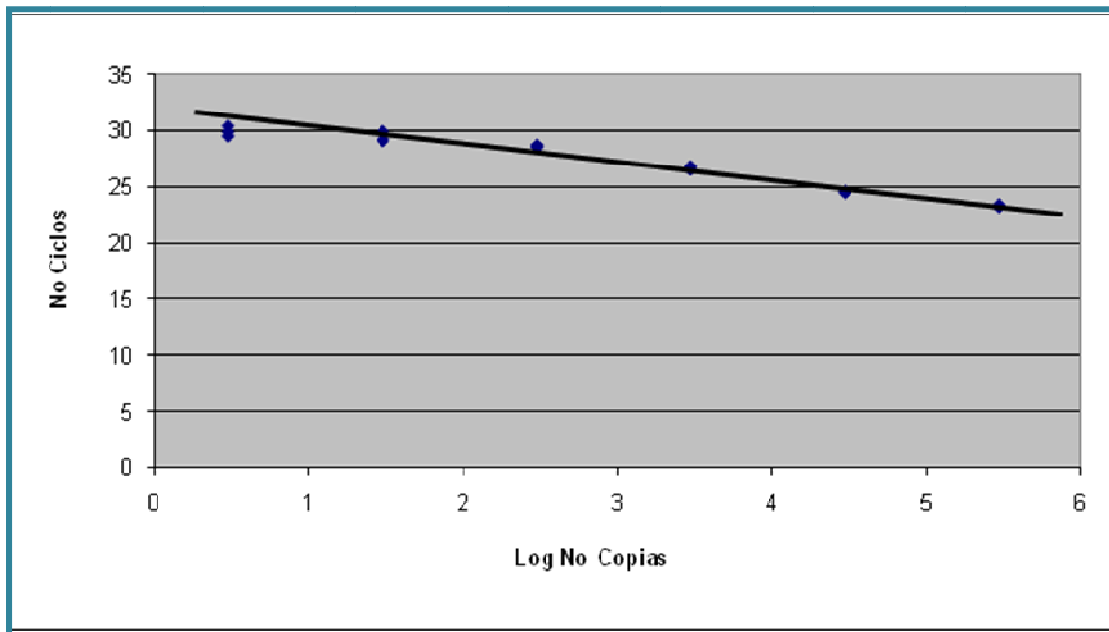


Figura 24. Grafica de los valores de CT con respecto al logaritmo del número de copias de la reacción que amplifica una región de la proteína E del genoma del VON.

Una vez estandarizados los ensayos de qPCR se procedió al análisis de las muestras biológicas de los donadores de sangre y de los pacientes neurológicos. En cada ensayo se incluyeron testigos positivos y negativos por duplicado. En el caso de los pacientes neurológicos se analizaron los RNAs extraídos tanto de suero como de LCR. Ninguno de los sujetos analizados presentó bandas de amplificación al analizarse para las dos regiones del genoma del VON. Tampoco se obtuvieron líneas de amplificación para los testigos de especificidad (RNAs del VHC y el VD) (Figuras 25).

Se analizaron por qPCR 800 muestras de suero de donadores de sangre y ninguna de las muestras fue positiva. En el ensayo de la región 3'UTR se corrieron testigos negativos por duplicado y 4 diluciones del RNA testigo positivo. Para el ensayo de la proteína E se corrieron las muestras de los donadores incluyendo dos testigos negativos y un testigo de RNA.

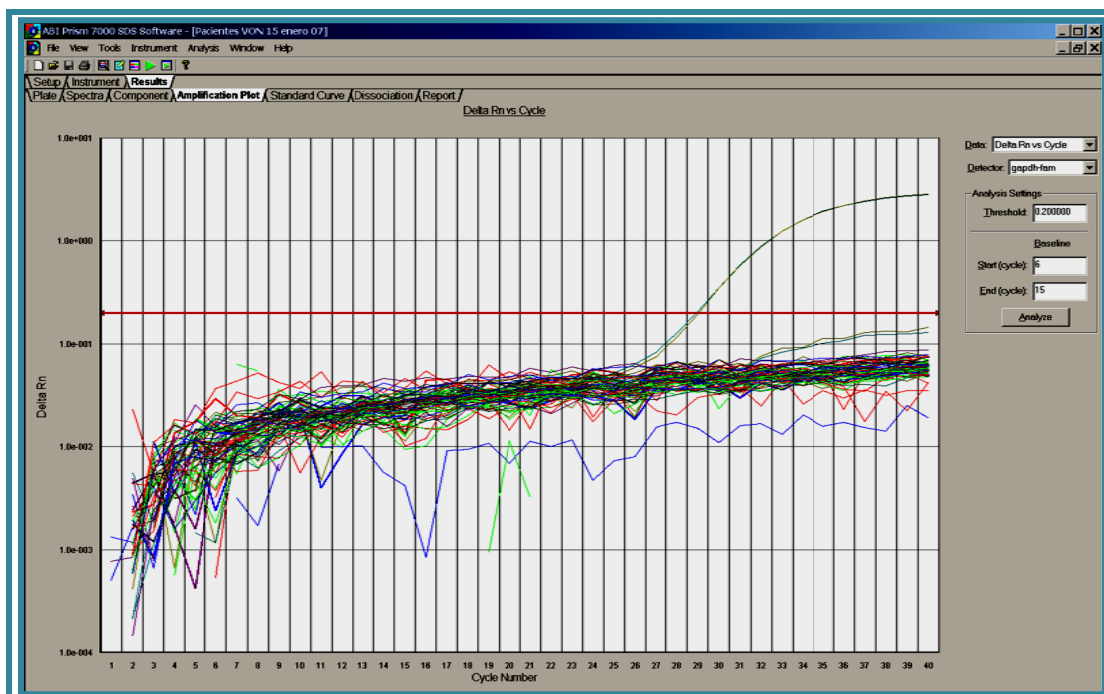


Figura 25. Resultados obtenidos para las muestras de suero y LCR de los pacientes neurológicos para la región de la proteína E del VON. Ninguno de los pacientes analizados mostró líneas de amplificación. Las dos líneas de amplificación que se observan corresponden a el RNA testigo positivo, el cual se corrió por duplicado.

VI.3.2 Reacción de amplificación por medio de RT-PCR anidado

Para la identificación del genoma del VON a partir del RNA se estandarizó la reacción de RT-PCR anidada a partir de un RNA control positivo proveniente de la cepa EG 101 del VON. Se utilizaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento de proteína C y la proteína pre M. Los productos amplificados corresponden a un tamaño de 408 para el PCR1 y de 193 pb para la PCR anidada. Se obtuvieron las bandas de amplificación de 1 tamaño esperado (Figura 26). En cada reacción se incluyeron controles negativos y controles de RNA de otros flavivirus (VD y el VHC) para analizar la especificidad de la reacción. La reacción permitió amplificar hasta 10 copias de la reacción. Ninguna de las muestras analizadas de los grupos I y II fue positiva.

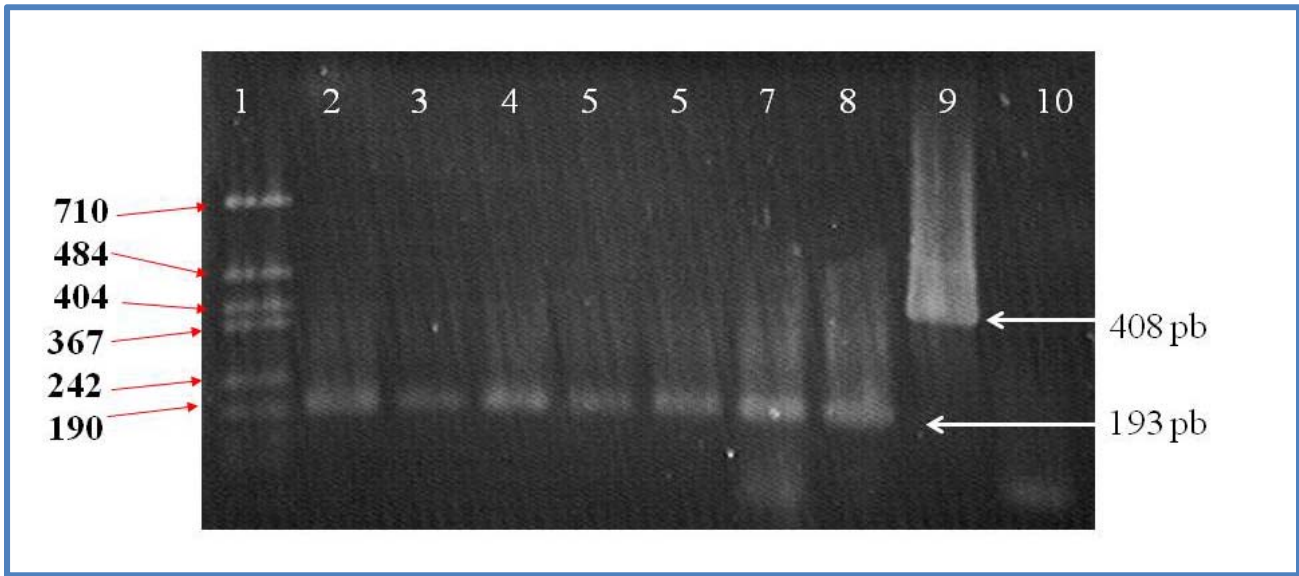


Figura 26. Electroferograma de productos de la región de la proteína C y Pre M del genoma del VON. En la figura se muestra un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En el carriles 1 se muestra el marcador de tamaño molecular. Los carriles del 2 al 8 corresponden a los productos amplificados de la PCR anidada, el carril 9 corresponde a la reacción de PCR1 y el carril 10 es el control negativo.

VII. DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron un total de 1432 muestras de sangre provenientes de donadores de sangre, pacientes febriles y pacientes con enfermedad neurológica aséptica. Al realizar los estudios de detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG anti-VON por ELISA ninguno de los sujetos estudiados presentó anticuerpos del tipo IgM anti-VON, lo que nos sugiere que ninguno de los sujetos analizados había cursado con una infección reciente ocasionada por el VON. Es importante mencionar que los anticuerpos IgM anti-VON permanecen por más de un año en los sujetos que fueron infectados, lo que nos indica que muy probablemente ninguno de los sujetos había estado en contacto con el virus en el último año (Kramer et al, 2007).

Se encontró evidencia serológica de anticuerpos IgG-VON en porcentajes del 33 al 50% en los grupos analizados. Todas estas muestras fueron analizadas también para la detección de anticuerpos del tipo IgG anti-VD. Se encontró que todas las muestras positivas para anticuerpos del tipo IgG anti-VON eran también positivas para los anticuerpos IgG anti-VD. Los reportes indican que las pruebas de detección de anticuerpos IgG anti-flavivirus son menos específicas que las de detección de anticuerpos IgM (Johnson et al, 2000). Los estuches comerciales indican que la reactividad cruzada puede presentarse en el 95% de las muestras de pacientes previamente expuestos al VD, en este estudio el 100% de las muestras presentaron reactividad cruzada. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios, quienes también obtuvieron un 100% de reactividad cruzadas en muestras de pacientes con exposición previa al VD (Niedrig et al, 2007). La prueba de ELISA para anticuerpos IgG-VON resultó ser no informativa para nuestra población debido a la reactividad cruzada. Para realizar el diagnóstico de la infección por el VON en nuestra población fué necesario realizar pruebas confirmatorias como los ensayos de PNRP. Cuando se realizó la detección de anticuerpos IgM-VD se encontró que el 2% de los donadores de sangre analizados eran positivos para esta prueba. Este hallazgo nos indica que estos donadores estaban cursando o habían cursado con una infección reciente por el VD. Reportes recientes han confirmado que la infección por el VD puede transmitirse por medio de transfusiones sanguíneas (Tambyah et al, 2008). El impacto de las donaciones con sangre contaminada por el VON y el VD no había sido analizado en nuestro país. En cuanto a la detección de anticuerpos de memoria (IgG) el 59% de los donadores dieron positiva esta prueba, lo que nos indica que los sujetos analizados habían estado en contacto con el VD y habían padecido la infección en algún momento de su vida. En los cuestionarios realizados a los donadores encontramos que solo el 3% de los sujetos estaba consciente de haber padecido una infección por VD o al menos así lo mencionaron al momento de la entrevista- Es

importante considerar el hecho de que los sujetos entrevistados pueden ocultar información al momento de la entrevista. Los datos obtenidos en este estudio evidencian la importancia implementar pruebas de detección del VD en los bancos de sangre en regiones endémicas para el VD. El monitoreo de detección del VD podría realizarse en los meses del año en los que se presentan brotes por este virus.

En el grupo de paciente febriles se encontró que el 7.5% de los sujetos analizados eran positivos para IgM-VD. Todos los sujetos positivos para esta prueba presentaron también anticuerpos IgG-VD. Es importante mencionar que las muestras de este grupo de estudio fueron tomadas durante la temporada de verano que es cuando se presentan brotes por el VD en nuestra región.

En el grupo de pacientes neurológicos no se detectaron sujetos positivos para anticuerpos IgM-VD. Esta reportado que el VD puede ocasionar cuadros clínicos de encefalitis, en este estudio nuestros resultados indican que de nuestro grupo de pacientes con encefalitis ninguno estaba cursando con una infección reciente por el VD (Hommel et al, 1998; Muzaffar et al, 2006).

La prueba de PNRP se considera el estándar de oro para realizar un diagnóstico confirmatorio de una infección por el VON (Dauphin y Zientara, 2007). Las pruebas de PNRP se realizaron a un total de 147 muestras positivas para anticuerpos IgG anti-VON, de las cuales 6 fueron confirmadas como positivas para la detección de anticuerpos neutralizantes anti-VON (dos donadores de sangre y cuatro sujetos con enfermedad febril). Todos los sujetos positivos eran procedentes del estado de Nuevo León y ninguno tenía antecedentes de haber padecido alguna infección semejante a una fiebre por el VD. Al momento de la entrevista, ninguno de los sujetos mencionó haber padecido alguna infección neurológica en algún momento de su vida. Estos datos nos sugieren que los sujetos positivos tuvieron una infección previa por el VON en algún momento de su vida y que probablemente ninguno presentó un cuadro sintomático al exponerse al VON. En el caso de los cuatro pacientes con enfermedad febril que fueron positivos para anticuerpos neutralizantes anti-VON, los resultados nos sugieren que el VON no era el causante de la sintomatología que presentaron los sujetos al momento de la consulta y la toma de muestras. Es posible que estos pacientes estuvieran cursando con otro tipo de infecciones como las causadas por el virus de la influenza, una infección secundaria por el VD, entre otras.

Las pruebas de PNRP evidenciaron que el 41% de las muestras analizadas fueron seropositivas para el VD serotipo 1 y 15% fueron positivas para el VD serotipo 2. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en el 2004 en las ciudades fronterizas de Matamoros, Tamaulipas y Brownsville, Texas, en donde se reportó que los serotipos 1 y 2 del VD eran responsables de los casos de infecciones en humanos (Brunkard et al, 2007; Ramos et al, 2008).

Las pruebas de PNRP confirman que la incidencia del VON en humanos del Noreste de México es baja en comparación con estudios realizados en Ontario, Canadá, en donde el 3.1% de las muestras de sujetos residentes analizadas fueron seropositivas para el VON (Loeb et al, 2005). En otro estudio realizado en Wyoming en el 2003, el 14% de los sujetos analizados tenían anticuerpos anti-VON (Murphy et al, 2005).

Los estudios de detección del genoma viral se realizaron solamente a los grupos en el grupo de I y III. Las muestras del grupo II no fueron analizadas con pruebas de detección del genoma viral debido a que fueron recolectadas en el laboratorio estatal y no se habían mantenido en las condiciones óptimas de preservación del RNA.

Para el diseño de los iniciadores de la RT-PCR convencional y los ensayos de qPCR se emplearon regiones del VON conservadas y que son diferentes a las de otros *Flavivirus*, lo que nos permitió tener una reacción altamente específica. Para validar los ensayos se incluyeron muestras positivas para otros flavivirus (VD y el Virus de la Hepatitis C), las cuales resultaron negativas con todos los juegos de oligonucleótidos y sondas diseñadas para este trabajo. Las muestras positivas para el VD y el VHC utilizadas para validar la especificidad del ensayo fueron previamente confirmadas por RT-PCR.

Se realizaron ensayos de RT-PCR convencional y de qPCR. Al realizar los ensayos para analizar la sensibilidad de las pruebas observamos que los ensayos de qPCR fueron 100 veces más sensibles que los de PCR convencional. Las pruebas de qPCR permitieron detectar desde 3 copias hasta 300,000 copias, los ensayos de RT-PCR convencional los límites de detección fueron de 300 a 300,000 copias y la prueba de RT-PCR anidada permitió amplificar de 100,000 hasta 10 copias por reacción. En los ensayos de qPCR se graficaron los valores de log de número de copias contra los valores de Ct (ciclos de amplificación) y se obtuvieron los coeficientes de variación para las regiones 3'UTR y proteína E (0.95 y 0.96 respectivamente). Aunque en nuestro estudio empleamos la técnica de qPCR como un método cualitativo, el análisis de los coeficientes de correlación de las curvas indica que para realizar una cuantificación del número de copias en las muestras fue necesario hacer ajustes en uno de los extremos de las curvas y eliminar la concentración de 3 copias. Este ajuste nos permite tener coeficientes de correlación de 0.98 y mejorar el método si se quiere aplicar como un método cuantitativo. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores que encuentran mayor sensibilidad en las pruebas de qPCR que en las de RT-PCR convencional.

El hecho de que no se detectaran sujetos con viremia para el VON puede deberse a la baja frecuencia de las infecciones por el VON en nuestra región y a que en humanos la viremia es muy corta y puede detectarse en pacientes con fiebre por VON solo hasta el cuarto día de inicio de los síntomas, después

de este tiempo la posibilidad de encontrar el virus en sangre es muy baja. El período corto de viremia en humanos limita las posibilidades de identificar el genoma viral en muestras de pacientes con más de 4 días de evolución de la enfermedad.

Ninguno de los pacientes con neuroinfección fue positivo para el VON. Esto sugiere que estos pacientes estaban cursando con otro tipo de infecciones. Entre los principales virus causantes de meningitis aséptica se encuentran los enterovirus (echovirus, coxsackievirus, no-poliovirus), arbovirus, virus de herpes simple (VHS), virus de parotiditis. Los enterovirus son la principal causa de meningitis aséptica en Estados Unidos, con aproximadamente 75,000 casos por año (Rotbart et al, 1998). En nuestro país actualmente solo se han realizado descripciones clínicas de los casos de meningitis aséptica en poblaciones de niños, y no se han realizado estudios para determinar los principales agentes causales. En un reporte del Instituto Nacional de Neurología se publicó la frecuencia de los diagnósticos de egreso, encontrando la encefalitis viral aguda entre las tres primeras, sin reportar agente etiológico específico, resaltando la escasez de información al respecto en nuestro país (Soto-Hernández, 2002).

Las infecciones transmitidas por virus de la familia *Flaviviridae* se encuentran entre las enfermedades transmisibles con mayor incidencia en el mundo (Kramer et al, 2007; Jones et al, 2008; Petersen y Hayes, 2008; Vasilakis y Weaver, 2008). En el caso de las infecciones ocasionadas por el VON y el VD la mayoría de los sujetos infectados (70 a un 80%) cursan con infecciones subclínicas, lo que no les permite darse cuenta de que están cursando con una infección viral (Gubler, 2007; Kramer et al, 2007). En México, tanto el VON como el VD se encuentran activos y se tiene evidencia que estos *Flavivirus* presentan año con año un incremento en el número de casos a nivel mundial (Teixeira Mda et al, 2005; Gubler, 2007).

La actividad del VON en el Noreste de México está bien documentada en animales (Blitvich et al, 2003b; Blitvich et al, 2004; Deardorff et al, 2006). Existen reportes de aves (residentes y migratorias) y caballos infectadas con VON en los estados de Nuevo León y Tamaulipas (Blitvich et al, 2003b; Fernandez-Salas et al, 2003; Blitvich et al, 2004; Elizondo-Quiroga et al, 2005; Fernandez-Salas et al, 2007). La alta prevalencia de casos en humanos y caballos en los estados fronterizos del Sur de los EUA es el principal factor de riesgo para la presencia de un brote por VON en el Noreste de México. En los últimos 3 años el número de pacientes infectados en el estado de Texas se ha incrementado en un 187%. Debido al gran número de casos, actualmente los bancos de sangre del estado de Texas monitorean por medio de pruebas de detección del genoma viral la presencia del VON para prevenir infecciones debidas a transfusiones sanguíneas.

Los casos de reportes en humanos infectados por el VON en México son muy escasos, uno de ellos corresponde a una paciente de Sonora, la cual fue diagnosticada por el CDC de los EUA, se reportó el caso de un donador de sangre positivo para anticuerpos IgM anti-VON que fue confirmado por amplificación mediada por transcripción y otro caso reportado por la SSA del estado de Oaxaca (pendiente por confirmar) (Elizondo-Quiroga et al, 2005; Sanchez-Guerrero et al, 2006). Es importante realizar más estudios en humanos, ya que la gran mayoría de las investigaciones que se realizan actualmente están enfocadas en la búsqueda del VON en animales (INSP, 2009). En este estudio se detectaron 6 individuos con anticuerpos neutralizantes anti-VON.

En el análisis estadístico se identificó que al comparar los sujetos con exposición previa a flavivirus el género femenino tiene 1.85 veces más riesgo a una infección por *flavivirus* que el género masculino. Al comparar los sujetos con exposición a *flavivirus* contra el intervalo de edad se encontró que los sujetos en in intervalo de edad menor a los 10 años, presentan menor exposición por *flavivirus*. Los sujetos de entre 61 a 70 años de edad tienen más riesgo a infección por *flavivirus* comparado con los otros grupos de edad; debido a que a que todos los sujetos de este grupo (100%) fueron positivos para IgG VD. Al comparar los sujetos con exposición a *flavivirus* contra la procedencia, específicamente del estado de Nuevo León se encontró que los originarios del municipio de Cerralvo y Escobedo tienen menos riesgo a una infección por *flavivirus* comparado con otros municipios del estado de NL. Los residentes del municipio de *Guadalupe, Santa Catarina y Monterrey* tienen más riesgo a una infección por *flavivirus* comparado con otros municipios del estado de N.L. Probablemente las condiciones de hacinamiento y otras características ambientales incrementen el riesgo a las infecciones por flavivirus en los sujetos residentes de estos municipios.

Los resultados de nuestro estudio indican que hay una alta frecuencia de seropositividad para anticuerpos IgG anti-VON y anti-VD en humanos.

Es importante señalar que México es un área endémica para el VD, miembro de la misma familia de *Flavivirus*, y que estudios en animales han demostrado que la exposición previa a otros *Flavivirus* confiere ventajas al huésped para no desarrollar enfermedad severa por el VON. Este estudio refuerza la teoría de la seroprotección de las poblaciones endémicas para otros *Flavivirus* para no presentar brotes severos del VON como actualmente sucede en EUA.

Indudablemente, la llegada del VON a México viene a sumarse a otras enfermedades emergentes y transmitidas por vectores; y plantean un reto a la investigación y a los programas de prevención y control de vectores del sector salud.

Dentro de los objetivos de este estudio planteamos explicar porque en esta región no se habían observado brotes del VON en humanos. En este estudio detectamos una gran cantidad de individuos (58% a un 67%) que habían sido previamente expuestos a flavivirus (VON, DEN 1 y DEN 2) y que presentaban anticuerpos del tipo IgG. Los estudios de PNRP demostraron que la mayoría de los sujetos con anticuerpos del tipo IgG habían sido expuestos al VD. Estos resultados nos indican que la mayoría de los individuos estudiados tuvieron una exposición previa a uno o más flavivirus.

Nosotros proponemos que la principal razón de la ausencia de casos anuales del VON en humanos en el Noreste de México es que una gran proporción de la población estudiada ha sido infectada con el VD y por lo tanto son resistentes o menos susceptibles a padecer una infección severa por el VON. Estudios de laboratorio muestran que los roedores, monos y cerdos expuestos a flavivirus generan anticuerpos heterólogos, los cuales reducen la severidad de las infecciones subsecuentes con el VON (Price y Thind, 1971; Goverdhan et al, 1992; Ilkal et al, 1994; Tesh et al, 2002). La baja incidencia de sujetos con enfermedad por el VON en México, Centro y Sud América puede ser atribuida a la exposición previa al VD. En Latino América ocurrieron más de 850, 000 casos de fiebre por VD en el 2007, incluyendo 25, 000 casos de fiebre hemorrágica (Kyle y Harris, 2008). Sin embargo, el hecho de que no se hayan presentado grandes brotes con muertes en aves y caballos no puede explicarse de la misma forma que para humanos, ya que el VD no suele replicarse en vertebrados no primates (Thomas et al, 2003). Entonces es muy probable que existan otros factores que estén contribuyendo al esparcimiento del VON en Latino América. Los hallazgos de aves residentes y migratorias amplificadoras del VON presentes en nuestra región es importante desde el punto de vista epidemiológico. Este hallazgo indica la actividad viral en niveles prevalentes/endémicos en el Norte de Nuevo León. La alta prevalencia de seropositividad en caballos en el noreste de México nos indica que desde el punto de vista epidemiológico, la cercanía del Sur de los Estados Unidos es un factor de riesgo importante que contribuye al esparcimiento del VON en esta región (Fernandez-Salas et al, 2007).

Nosotros especulamos que la inmunidad preexistente del VD en la población estudiada es la principal razón por la cual no se ha observa un brote mayor de enfermedad por el VON en humanos en el Noreste de México. Debido a que el VD es endémico en la mayor parte de las regiones de Latino América, este fenómeno pudiera ser un factor crítico determinante para definir la distribución geográfica y la importancia en la salud pública de la infección por el VON en las Américas.

VIII. CONCLUSIONES

- Se establecieron las pruebas serológicas para detección de anticuerpos del tipo IgG e IgM contra el VON y el VD. Se encontró una alta prevalencia de los anticuerpos IgG del VON en los grupos de estudio analizados (33-58%).
- En este estudio no se detectó reactividad cruzada entre las pruebas de detección de anticuerpos del tipo IgM anti-VON y anti-VD, por lo que concluimos que las pruebas para detección de anticuerpos del tipo IgM contra el VON en áreas endémicas para el VD son de gran utilidad.
- El 100% de las muestras positivas para anticuerpos del tipo IgG-VON por medio de ELISA presentó reactividad cruzada con los anticuerpos IgG del VD, lo que nos indica que este tipo de pruebas no son informativas para las poblaciones endémicas para el VD.
- La mayoría de los sujetos estudiados (58 al 67%) habían tenido exposición previa al VD. Este hallazgo confirma que la región del Noreste de México es un área endémica para el VD.
- El 2 % de los donadores analizados presentaron anticuerpos de respuesta temprana (IgM) contra el VD, lo que nos indica que estos sujetos asistieron a donar sangre teniendo una infección reciente por VD o cursando en ese momento con una infección por VD.
- Ninguno de los sujetos analizados fue positivo para anticuerpos IgM contra el VON, lo que no indica una baja prevalencia de esta infección en nuestra región. Este hallazgo indica que el impacto de esta infección en salud pública en nuestra población es diferente a la que se reporta actualmente en poblaciones vecinas como EUA.
- Se detectaron 6 muestras positivas para anticuerpos neutralizantes contra el VON utilizando la técnica de PNRP. Las muestras analizadas por PNRP mostraron que el VD era el responsable de la mayoría de las infecciones. Los datos obtenidos indican que la incidencia de las infecciones por el VON en la población del noreste de México es baja.

- La prevalencia de anticuerpos anti-VD en la población estudiada es alta. Este estudio refuerza la teoría de la seroprotección de las infecciones por el VON en poblaciones expuestas a otros flavivirus. Sin embargo, se requieren estudios complementarios para reforzar la teoría de una seroprotección en regiones endémicas para el VD.
- La técnica de qPCR demostró ser altamente sensible y específica. Los ensayos de qPCR estandarizados fueron 100 veces más sensibles que los de PCR convencional.
- Para realizar el diagnóstico confirmatorio para el VON en áreas endémicas es indispensable el uso de pruebas de detección del genoma viral que confirmen la presencia del genoma del VON (qPCR o RT-PCR convencional) o el uso de pruebas serológicas confirmatorias (PNRP).
- Es importante realizar estudios del impacto en la salud de los receptores de unidades de sangre contaminada con el VD. La detección de anticuerpos del tipo IgM o PCR para la identificación de donadores infectados con el VD debe realizarse especialmente en los meses del año en los que la actividad del vector es mayor y así evitar transfundir sangre contaminada.

IX. PERSPECTIVAS

Ya que la infección por el VON es una infección emergente, es importante que se siga monitoreando la presencia del virus en pacientes con cuadros clínicos febriles y en pacientes con neuroinfecciones asépticas que ingresan a los sistemas de salud, esto con el fin de monitorear el impacto que el virus tendrá en nuestra población en los siguientes años. Ya que esta enfermedad es una zoonosis, es importante que durante todo el año se realice la detección del virus en aves centinelas, reptiles y mamíferos susceptibles al VON, lo que permitiría la identificación de áreas y las temporadas en donde hay brotes, de esta manera se pueden tomar medidas de prevención para la población. También deben realizarse análisis serológicos y de detección del genoma viral en áreas rurales para monitorear a la población que se encuentra más expuesta a vectores y aves amplificadoras del VON.

El riesgo de contraer una infección por el VON o por el VDL por medio de transfusiones sanguíneas deberá ser evaluado en estados endémicos para estos virus. Es importante realizar estudios del impacto en la salud de los receptores de unidades de sangre contaminada con estos virus. La detección de anticuerpos del tipo IgM o PCR para la identificación de donadores infectados debe realizarse especialmente en los meses del año en los que la actividad del vector es mayor y así evitar transfundir sangre contaminada. Estos estudios permitirían una evaluación más completa del impacto en la salud humana de las infecciones del VON y del VD en los Bancos de sangre.

Se requieren estudios complementarios para reforzar la teoría de una seroprotección en regiones endémicas para el VD. Para reforzar esta teoría se deben realizar más estudios incluyendo también los estados de la república Mexicana que presentan menor número de casos de infecciones por el VD. Esto permitirá detectar el comportamiento del virus en las regiones de México en donde la mayoría de la población no ha tenido exposición al VD.

La detección del VON en pacientes sintomáticos permitirá identificar la cepas que se encuentran circulando en nuestro país. El análisis de estas cepas permitirá analizar los cambios que este virus está teniendo en su adaptación a esta nueva región.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, J. F. y J. J. Rahal.** 2002. Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerg Infect Dis* **8**:107-108.
- Anyamba, A., J. P. Chretien, J. Small, C. J. Tucker y K. J. Linthicum.** 2006. Developing global climate anomalies suggest potential disease risks for 2006-2007. *Int J Health Geogr* **5**:60.
- Arroyo, J., C. A. Miller, J. Catalan y T. P. Monath.** 2001. Yellow fever vector live-virus vaccines: West Nile virus vaccine development. *Trends Mol Med* **7**:350-354.
- Arroyo, J., C. Miller, J. Catalan, G. A. Myers, M. S. Ratterree, D. W. Trent y T. P. Monath.** 2004. ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. *J Virol* **78**:12497-12507.
- Batalis, N. I., L. Galup, S. R. Zaki y J. A. Prahlow.** 2005. West Nile virus encephalitis. *Am J Forensic Med Pathol* **26**:192-196.
- Beasley, D. W., C. T. Davis, J. Estrada-Franco, R. Navarro-Lopez, A. Campomanes-Cortes, R. B. Tesh, S. C. Weaver y A. D. Barrett.** 2004. Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico. *Emerg Infect Dis* **10**:2221-2224.
- Beasley, D. W.** 2005. Recent advances in the molecular biology of west nile virus. *Curr Mol Med* **5**:835-850.
- Blitvich, B. J., R. A. Bowen, N. L. Marlenee, R. A. Hall, M. L. Bunning y B. J. Beaty.** 2003a. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for detection of west nile virus antibodies in domestic mammals. *J Clin Microbiol* **41**:2676-2679.
- Blitvich, B. J., I. Fernandez-Salas, J. F. Contreras-Cordero, N. L. Marlenee, J. I. Gonzalez-Rojas, N. Komar, D. J. Gubler, C. H. Calisher y B. J. Beaty.** 2003b. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerg Infect Dis* **9**:853-856.
- Blitvich, B. J., I. Fernandez-Salas, J. F. Contreras-Cordero, M. A. Lorono-Pino, N. L. Marlenee, F. J. Diaz, J. I. Gonzalez-Rojas, N. Obregon-Martinez, J. A. Chiu-Garcia, W. C. t. Black y B. J. Beaty.** 2004. Phylogenetic analysis of West Nile virus, Nuevo Leon State, Mexico. *Emerg Infect Dis* **10**:1314-1317.
- Bouffard, J. P., M. A. Riudavets, R. Holman y E. J. Rushing.** 2004. Neuropathology of the brain and spinal cord in human West Nile virus infection. *Clin Neuropathol* **23**:59-61.
- Briese, T., W. G. Glass y W. I. Lipkin.** 2000. Detection of West Nile virus sequences in cerebrospinal fluid. *Lancet* **355**:1614-1615.
- Brinton, M. A.** 2002. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol* **56**:371-402.
- Brunkard, J. M., J. L. Robles Lopez, J. Ramirez, E. Cifuentes, S. J. Rothenberg, E. A. Hunsperger, C. G. Moore, R. M. Brussolo, N. A. Villarreal y B. M. Haddad.** 2007. Dengue fever seroprevalence and risk factors, Texas-Mexico border, 2004. *Emerg Infect Dis* **13**:1477-1483.
- CDC** Nov 17 1999, posting date. From the Centers for Disease Control and Prevention. Update: West Nile virus encephalitis--New York, 1999. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10573261]
- CDC** Dec 27 2000a, posting date. From the Centers for Disease Control and Prevention. Update: West Nile Virus activity--eastern United States, 2000. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11188916]

- CDC Feb 23 2000b, posting date. From the Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for surveillance, prevention, and control of West Nile virus infection--United States. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10697050]
- CDC May 2 2001, posting date. From the Centers for Disease Control and Prevention. Human West Nile virus surveillance--Connecticut, New Jersey, and New York, 2000. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11368043]
- CDC 2008, posting date. West Nile Virus. Statistics, Surveillance, and Control. [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&controlCaseCount08_detailed.htm]
- Chappell, K. J., M. J. Stoermer, D. P. Fairlie y P. R. Young.** 2008a. West Nile Virus NS2B/NS3 protease as an antiviral target. *Curr Med Chem* **15**:2771-2784.
- Chappell, K. J., M. J. Stoermer, D. P. Fairlie y P. R. Young.** 2008b. Mutagenesis of the West Nile virus NS2B cofactor domain reveals two regions essential for protease activity. *J Gen Virol* **89**:1010-1014.
- Chappell, W. A., D. R. Sasso, R. F. Toole y T. P. Monath.** 1971. Labile serum factor and its effect on arbovirus neutralization. *Appl Microbiol* **21**:79-83.
- Chomczynski, P. y N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159.
- Chu, J. J. y M. L. Ng.** 2004. Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. *J Biol Chem* **279**:54533-54541.
- Dauphin, G., S. Zientara, H. Zeller y B. Murgue.** 2004. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**:343-355.
- Dauphin, G. y S. Zientara.** 2007. West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine* **25**:5563-5576.
- Davis, C. T., G. D. Ebel, R. S. Lanciotti, A. C. Brault, H. Guzman, M. Siirin, A. Lambert, R. E. Parsons, D. W. Beasley, R. J. Novak, D. Elizondo-Quiroga, E. N. Green, D. S. Young, L. M. Stark, M. A. Drebot, H. Artsob, R. B. Tesh, L. D. Kramer y A. D. Barrett.** 2005. Phylogenetic analysis of North American West Nile virus isolates, 2001-2004: evidence for the emergence of a dominant genotype. *Virology* **342**:252-265.
- Davis, C. T., L. Li, F. J. May, R. Bueno, Jr., J. A. Dennett, A. A. Bala, H. Guzman, D. Quiroga-Elizondo, R. B. Tesh y A. D. Barrett.** 2007. Genetic stasis of dominant West Nile virus genotype, Houston, Texas. *Emerg Infect Dis* **13**:601-604.
- Deardorff, E., J. Estrada-Franco, A. C. Brault, R. Navarro-Lopez, A. Campomanes-Cortes, P. Paz-Ramirez, M. Solis-Hernandez, W. N. Ramey, C. T. Davis, D. W. Beasley, R. B. Tesh, A. D. Barrett y S. C. Weaver.** 2006. Introductions of West Nile virus strains to Mexico. *Emerg Infect Dis* **12**:314-318.
- Diamond, M. S. y R. S. Klein.** 2006. A genetic basis for human susceptibility to West Nile virus. *Trends Microbiol* **4**:287-289.
- Docherty, D. E., R. R. Long, K. M. Griffin y E. K. Saito.** 2004. Corvidae feather pulp and West Nile virus detection. *Emerg Infect Dis* **10**:907-909.
- Elizondo-Quiroga, D., C. T. Davis, I. Fernandez-Salas, R. Escobar-Lopez, D. Velasco Olmos, L. C. Soto Gastalum, M. Aviles Acosta, A. Elizondo-Quiroga, J. I. Gonzalez-Rojas, J. F. Contreras Cordero, H. Guzman, A. Travassos da Rosa, B. J. Blitvich, A. D. Barrett, B. J. Beaty y R. B. Tesh.** 2005. West Nile Virus isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerg Infect Dis* **11**:1449-1452.
- EMBL-EBI December 2005 2008, posting date. European Bioinformatics Institute. [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>]

- Estrada-Franco, J. G., R. Navarro-Lopez, D. W. Beasley, L. Coffey, A. S. Carrara, A. Travassos da Rosa, T. Clements, E. Wang, G. V. Ludwig, A. C. Cortes, P. P. Ramirez, R. B. Tesh, A. D. Barrett y S. C. Weaver.** 2003. West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis* **9**:1604-1607.
- Farfan-Ale, J. A., B. J. Blitvich, M. A. Lorono-Pino, N. L. Marlenee, E. P. Rosado-Paredes, J. E. Garcia-Rejon, L. F. Flores-Flores, L. Chulim-Perera, M. Lopez-Uribe, G. Perez-Mendoza, I. Sanchez-Herrera, W. Santamaria, J. Moo-Huchim, D. J. Gubler, B. C. Cropp, C. H. Calisher y B. J. Beaty.** 2004. Longitudinal studies of West Nile virus infection in avians, Yucatan State, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* **4**:3-14.
- Farfan-Ale, J. A., B. J. Blitvich, N. L. Marlenee, M. A. Lorono-Pino, F. Puerto-Manzano, J. E. Garcia-Rejon, E. P. Rosado-Paredes, L. F. Flores-Flores, A. Ortega-Salazar, J. Chavez-Medina, J. C. Cremieux-Grimaldi, F. Correa-Morales, G. Hernandez-Gaona, J. F. Mendez-Galvan y B. J. Beaty.** 2006. Antibodies to West Nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* **74**:908-914.
- Fernandez-Salas, I., J. F. Contreras-Cordero, B. J. Blitvich, J. I. Gonzalez-Rojas, A. Cavazos-Alvarez, N. L. Marlenee, A. Elizondo-Quiroga, M. A. Lorono-Pino, D. J. Gubler, B. C. Cropp, C. H. Calisher y B. J. Beaty.** 2003. Serologic evidence of West Nile Virus infection in birds, Tamaulipas State, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* **3**:209-213.
- Fernandez-Salas, I., M. de Lourdes Garza-Rodriguez, B. J. Beaty, J. R. Jimenez y A. M. Rivas-Estilla.** 2007. [Presence of west Nile virus in northeast Mexico]. *Salud Publica Mex* **49**:210-217.
- Gibbs, S. E., D. M. Hoffman, L. M. Stark, N. L. Marlenee, B. J. Blitvich, B. J. Beaty y D. E. Stallknecht.** 2005. Persistence of antibodies to West Nile virus in naturally infected rock pigeons (*Columba livia*). *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:665-667.
- Giladi, M., E. Metzkor-Cotter, D. A. Martin, Y. Siegman-Igra, A. D. Korczyn, R. Rosso, S. A. Berger, G. L. Campbell y R. S. Lanciotti.** 2001. West Nile encephalitis in Israel, 1999: the New York connection. *Emerg Infect Dis* **7**:659-661.
- Gottfried, K., R. Quinn y T. Jones.** 2005. Clinical description and follow-up investigation of human West Nile virus cases. *South Med J* **98**:603-606.
- Goverdhan, M. K., A. B. Kulkarni, A. K. Gupta, C. D. Tupe y J. J. Rodrigues.** 1992. Two-way cross-protection between West Nile and Japanese encephalitis viruses in bonnet macaques. *Acta Virol* **36**:277-283.
- Granwehr, B. P., K. M. Lillibridge, S. Higgs, P. W. Mason, J. F. Aronson, G. A. Campbell y A. D. Barrett.** 2004. West Nile virus: where are we now? *Lancet Infect Dis* **4**:547-556.
- Grinev, A., S. Daniel, S. Stramer, S. Rossmann, S. Caglioti y M. Rios.** 2008. Genetic variability of West Nile virus in US blood donors, 2002-2005. *Emerg Infect Dis* **14**:436-444.
- Gubler, D. J.** 2007. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Clin Infect Dis* **45**:1039-1046.
- Hayes, C. G.** 2001. West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Ann N Y Acad Sci* **951**:25-37.
- Hayes, E. B., N. Komar, R. S. Nasci, S. P. Montgomery, D. R. O'Leary y G. L. Campbell.** 2005a. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* **11**:1167-1173.
- Hayes, E. B., J. J. Sejvar, S. R. Zaki, R. S. Lanciotti, A. V. Bode y G. L. Campbell.** 2005b. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* **11**:1174-1179.

- Heinz, F. X. y S. L. Allison.** 2000. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv Virus Res* **55**:231-269.
- Herrmann, S., B. Leshem, S. Landes, B. Rager-Zisman y R. S. Marks.** 2005. Chemiluminescent optical fiber immunosensor for the detection of anti-West Nile virus IgG. *Talanta* **66**:6-14.
- Hogrefe, W. R., R. Moore, M. Lape-Nixon, M. Wagner y H. E. Prince.** 2004. Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus- and other flavivirus-specific antibodies. *J Clin Microbiol* **42**:4641-4648.
- Hommel, D., A. Talarmin, V. Deubel, J. M. Reynes, M. T. Drouet, J. L. Sarthou y A. Hulin.** 1998. Dengue encephalitis in French Guiana. *Res Virol* **149**:235-238.
- Ilkal, M. A., Y. Prasanna, P. G. Jacob, G. Geevarghese y K. Banerjee.** 1994. Experimental studies on the susceptibility of domestic pigs to West Nile virus followed by Japanese encephalitis virus infection and vice versa. *Acta Virol* **38**:157-161.
- INSP.** 2009. Resúmenes del 13 Congreso de Investigación en Salud Pública.
- Iwamoto, M., D. B. Jernigan, A. Guasch, M. J. Trepka, C. G. Blackmore, W. C. Hellinger, S. M. Pham, S. Zaki, R. S. Lanciotti, S. E. Lance-Parker, C. A. DiazGranados, A. G. Winqvist, C. A. Perlino, S. Wiersma, K. L. Hillyer, J. L. Goodman, A. A. Marfin, M. E. Chamberland y L. R. Petersen.** 2003. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* **348**:2196-2203.
- Johnson, A. J., D. A. Martin, N. Karabatsos y J. T. Roehrig.** 2000. Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **38**:1827-1831.
- Johnson, A. J., S. Langevin, K. L. Wolff y N. Komar.** 2003. Detection of anti-West Nile virus immunoglobulin M in chicken serum by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **41**:2002-2007.
- Johnson, A. J., A. J. Noga, O. Kosoy, R. S. Lanciotti, A. A. Johnson y B. J. Biggerstaff.** 2005. Duplex microsphere-based immunoassay for detection of anti-West Nile virus and anti-St. Louis encephalitis virus immunoglobulin m antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:566-574.
- Jones, K. E., N. G. Patel, M. A. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J. L. Gittleman y P. Daszak.** 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451**:990-993.
- Jupp, P. G. y B. M. McIntosh.** 1967. Ecological studies on Sindbis and West Nile viruses in South Africa. II. Mosquito bionomics. *S Afr J Med Sci* **32**:15-33.
- Kauffman, E. B., S. A. Jones, A. P. Dupuis, 2nd, K. A. Ngo, K. A. Bernard y L. D. Kramer.** 2003. Virus detection protocols for west nile virus in vertebrate and mosquito specimens. *J Clin Microbiol* **41**:3661-3667.
- Klenk, K., J. Snow, K. Morgan, R. Bowen, M. Stephens, F. Foster, P. Gordy, S. Beckett, N. Komar, D. Gubler y M. Bunning.** 2004. Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis* **10**:2150-2155.
- Kramer, L. D., J. Li y P. Y. Shi.** 2007. West Nile virus. *Lancet Neurol* **6**:171-181.
- Kyle, J. L. y E. Harris.** 2008. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol* **62**:71-92.
- Lanciotti, R. S., J. T. Roehrig, V. Deubel, J. Smith, M. Parker, K. Steele, B. Crise, K. E. Volpe, M. B. Crabtree, J. H. Scherret, R. A. Hall, J. S. MacKenzie, C. B. Cropp, B. Panigrahy, E. Ostlund, B. Schmitt, M. Malkinson, C. Banet, J. Weissman, N. Komar, H. M. Savage, W. Stone, T. McNamara y D. J. Gubler.** 1999. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* **286**:2333-2337.
- Lanciotti, R. S., A. J. Kerst, R. S. Nasci, M. S. Godsey, C. J. Mitchell, H. M. Savage, N. Komar, N. A. Panella, B. C. Allen, K. E. Volpe, B. S. Davis y J. T. Roehrig.** 2000. 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* **38**:4066-4071.
- Lanciotti, R. S. y A. J. Kerst.** 2001. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J Clin Microbiol* **39**:4506-4513.
- Lefrancois, T., B. J. Blitvich, J. Pradel, S. Molia, N. Vachier, G. Pallavicini, N. L. Marlenee, S. Zientara, M. Petitclerc y D. Martinez.** 2005. West Nile virus surveillance, Guadeloupe, 2003-2004. *Emerg Infect Dis* **11**:1100-1103.
- Loeb, M., S. J. Elliott, B. Gibson, M. Fearon, R. Nosal, M. Drebot, C. D'Cuhna, D. Harrington, S. Smith, P. George y J. Eyles.** 2005. Protective behavior and West Nile virus risk. *Emerg Infect Dis* **11**:1433-1436.
- Lorono-Pino, M. A., B. J. Blitvich, J. A. Farfan-Ale, F. I. Puerto, J. M. Blanco, N. L. Marlenee, E. P. Rosado-Paredes, J. E. Garcia-Rejon, D. J. Gubler, C. H. Calisher y B. J. Beaty.** 2003. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg Infect Dis* **9**:857-859.
- Marchuk D, D. M., Saulino A, Collins SC.** 1990. Construct of T-vectors and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Research* **19**:1154-1155.
- McIntosh, B. M., D. B. Dickinson y G. M. McGillivray.** 1969. Ecological studies on Sindbis and West Nile viruses in South Africa. V. The response of birds to inoculation of virus. *S Afr J Med Sci* **34**:77-82.
- Monath, T. P., J. Liu, N. Kanesa-Thanan, G. A. Myers, R. Nichols, A. Deary, K. McCarthy, C. Johnson, T. Ermak, S. Shin, J. Arroyo, F. Guirakhoo, J. S. Kennedy, F. A. Ennis, S. Green y P. Bedford.** 2006. A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:6694-6699.
- Mukhopadhyay, S., B. S. Kim, P. R. Chipman, M. G. Rossmann y R. J. Kuhn.** 2003. Structure of West Nile virus. *Science* **302**:248.
- Murphy, T. D., J. Grandpre, S. L. Novick, S. A. Seys, R. W. Harris y K. Musgrave.** 2005. West Nile virus infection among health-fair participants, Wyoming 2003: assessment of symptoms and risk factors. *Vector Borne Zoonotic Dis* **5**:246-251.
- Muzaffar, J., P. Venkata Krishnan, N. Gupta y P. Kar.** 2006. Dengue encephalitis: why we need to identify this entity in a dengue-prone region. *Singapore Med J* **47**:975-977.
- Nash, D., F. Mostashari, A. Fine, J. Miller, D. O'Leary, K. Murray, A. Huang, A. Rosenberg, A. Greenberg, M. Sherman, S. Wong y M. Layton.** 2001. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* **344**:1807-1814.
- NCBI.** 2008. Basic Local Alignment Search Tool National Center for Biotechnology Information. Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Niedrig, M., K. Sonnenberg, K. Steinhagen y J. T. Paweska.** 2007. Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation. *J Virol Methods* **139**:103-105.
- Nixon, M. L. y H. E. Prince.** 2006. West Nile virus immunoglobulin A (WNV IgA) detection in cerebrospinal fluid in relation to WNV IgG and IgM reactivity. *J Clin Virol* **37**:174-178.
- O'Leary, D. R., A. A. Marfin, S. P. Montgomery, A. M. Kipp, J. A. Lehman, B. J. Biggerstaff, V. L. Elko, P. D. Collins, J. E. Jones y G. L. Campbell.** 2004. The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002. *Vector Borne Zoonotic Dis* **4**:61-70.
- Paddock, C. D., W. L. Nicholson, J. Bhatnagar, C. S. Goldsmith, P. W. Greer, E. B. Hayes, J. A. Risko, C. Henderson, C. G. Blackmore, R. S. Lanciotti, G. L. Campbell y S. R. Zaki.** 2006. Fatal hemorrhagic fever caused by West Nile virus in the United States. *Clin Infect Dis* **42**:1527-1535.

- Petersen, L. R. y E. B. Hayes.** 2008. West Nile virus in the Americas. *Med Clin North Am* **92**:1307-1322, ix.
- Pletnev, A. G., G. G. Karganova, T. I. Dzhivanyan, V. A. Lashkevich y M. Bray.** 2000. Chimeric Langat/Dengue viruses protect mice from heterologous challenge with the highly virulent strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology* **274**:26-31.
- Pletnev, A. G., R. Putnak, J. Speicher, E. J. Wagar y D. W. Vaughn.** 2002. West Nile virus/dengue type 4 virus chimeras that are reduced in neurovirulence and peripheral virulence without loss of immunogenicity or protective efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3036-3041.
- Pletnev, A. G., M. S. Claire, R. Elkins, J. Speicher, B. R. Murphy y R. M. Chanock.** 2003. Molecularly engineered live-attenuated chimeric West Nile/dengue virus vaccines protect rhesus monkeys from West Nile virus. *Virology* **314**:190-195.
- Pôle-Bioinformatique-Lyonnais** January 5th, 2008 2008, posting date. CAP3 Sequence Assembly Program. [<http://pbil.univ-lyon1.fr/>]
- Price, W. H. y I. S. Thind.** 1971. Protection against West Nile virus induced by a previous injection with dengue virus. *Am J Epidemiol* **94**:596-607.
- Prince, H. E., M. Lape'-Nixon, R. J. Moore y W. R. Hogrefe.** 2004. Utility of the focus technologies west nile virus immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for testing cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* **42**:12-15.
- Prince, H. E. y M. Lape-Nixon.** 2005. Evaluation of a West Nile virus immunoglobulin A capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:231-233.
- Ramos, M. M., H. Mohammed, E. Zielinski-Gutierrez, M. H. Hayden, J. L. Lopez, M. Fournier, A. R. Trujillo, R. Burton, J. M. Brunkard, L. Anaya-Lopez, A. A. Banicki, P. K. Morales, B. Smith, J. L. Munoz y S. H. Waterman.** 2008. Epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever at the Texas-Mexico border: results of a household-based seroepidemiologic survey, December 2005. *Am J Trop Med Hyg* **78**:364-369.
- Rotbart, H. A., P. J. Brennan, K. H. Fife, J. R. Romero, J. A. Griffin, M. A. McKinlay y F. G. Hayden.** 1998. Enterovirus meningitis in adults. *Clin Infect Dis* **27**:896-898.
- Sambrook J, R. D. (ed.).** 2001. *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Third Edition ed.
- Samuel, C. E.** 2002. Host genetic variability and West Nile virus susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:11555-11557.
- Samuel, M. A., K. Whitby, B. C. Keller, A. Marri, W. Barchet, B. R. Williams, R. H. Silverman, M. Gale, Jr. y M. S. Diamond.** 2006. PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *J Virol* **80**:7009-7019.
- Sanchez-Guerrero, S. A., S. Romero-Estrella, A. Rodriguez-Ruiz, L. Infante-Ramirez, A. Gomez, E. Villanueva-Vidales, M. Garcia-Torres, A. M. Dominguez, J. A. Vazquez, E. D. Calderon, L. Valiente-Banueta, J. M. Linnen, A. Broulik, W. Harel y Y. L. R. A. Marin.** 2006. Detection of West Nile virus in the Mexican blood supply. *Transfusion* **46**:111-117.
- Scaramozzino, N., J. M. Crance, A. Jouan, D. A. DeBriel, F. Stoll y D. Garin.** 2001. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol* **39**:1922-1927.
- Shi, P. Y., E. B. Kauffman, P. Ren, A. Felton, J. H. Tai, A. P. Dupuis, 2nd, S. A. Jones, K. A. Ngo, D. C. Nicholas, J. Maffei, G. D. Ebel, K. A. Bernard y L. D. Kramer.** 2001. High-throughput detection of West Nile virus RNA. *J Clin Microbiol* **39**:1264-1271.
- Shirato, K., H. Miyoshi, H. Kariwa y I. Takashima.** 2005. Detection of West Nile virus and Japanese encephalitis virus using real-time PCR with a probe common to both viruses. *J Virol Methods* **126**:119-125.

- Smithburn, K. C., Hughes T.P., Burke A.W., Paul A.J.** 1940. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med* **20**:471-492.
- Snappin, K. W., E. C. Holmes, D. S. Young, K. A. Bernard, L. D. Kramer y G. D. Ebel.** 2007. Declining growth rate of west nile virus in north america. *J Virol* **81**:2531-2534.
- Solomon, T., M. H. Ooi, D. W. Beasley y M. Mallewa.** 2003. West Nile encephalitis. *Bmj* **326**:865-869.
- Soto-Hernández, J. L.** 2002. Infecciones del sistema nervioso central. *Gac Méd Méx* **138**.
- Stoermer, M. J., K. J. Chappell, S. Liebscher, C. M. Jensen, C. H. Gan, P. K. Gupta, W. J. Xu, P. R. Young y D. P. Fairlie.** 2008. Potent cationic inhibitors of West Nile virus NS2B/NS3 protease with serum stability, cell permeability and antiviral activity. *J Med Chem* **51**:5714-5721.
- Tambyah, P. A., E. S. Koay, M. L. Poon, R. V. Lin y B. K. Ong.** 2008. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med* **359**:1526-1527.
- Tang, Y., C. Anne Hapip, B. Liu y C. T. Fang.** 2006. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *J Clin Virol* **36**:177-182.
- Teixeira Mda, G., C. Costa Mda, M. L. Barreto y E. Mota.** 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saude Publica* **21**:1307-1315.
- Tesh, R. B., A. P. Travassos da Rosa, H. Guzman, T. P. Araujo y S. Y. Xiao.** 2002. Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerg Infect Dis* **8**:245-251.
- Thomas, S. J., D. Strickman y D. W. Vaughn.** 2003. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv Virus Res* **61**:235-289.
- Tilley, P. A., R. Walle, A. Chow, G. C. Jayaraman, K. Fonseca, M. A. Drebot, J. Preiksaitis y J. Fox.** 2005. Clinical utility of commercial enzyme immunoassays during the inaugural season of West Nile virus activity, Alberta, Canada. *J Clin Microbiol* **43**:4691-4695.
- Uchil, P. D., A. V. Kumar y V. Satchidanandam.** 2006. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. *J Virol* **80**:5451-5464.
- Ulloa, A., H. H. Ferguson, J. D. Mendez-Sanchez, R. Danis-Lozano, M. Casas-Martinez, J. G. Bond, J. C. Garcia-Zebadua, A. Orozco-Bonilla, J. A. Juarez-Ordaz, J. A. Farfan-Ale, J. E. Garcia-Rejon, E. P. Rosado-Paredes, E. Edwards, N. Komar, H. K. Hassan, T. R. Unnasch y M. A. Rodriguez-Perez.** 2009. West Nile Virus Activity in Mosquitoes and Domestic Animals in Chiapas, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis*.
- van der Meulen, K. M., M. B. Pensaert y H. J. Nauwynck.** 2005. West Nile virus in the vertebrate world. *Arch Virol* **150**:637-657.
- Vasilakis, N. y S. C. Weaver.** 2008. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res* **72**:1-76.
- Weinberger, M., S. D. Pitlik, D. Gandacu, R. Lang, F. Nassar, D. Ben David, E. Rubinstein, A. Izthaki, J. Mishal, R. Kitzes, Y. Siegman-Igra, M. Giladi, N. Pick, E. Mendelson, H. Bin y T. Shohat.** 2001. West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg Infect Dis* **7**:686-691.
- Wilson, J. R., P. F. de Sessions, M. A. Leon y F. Scholle.** 2008. West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J Virol* **82**:8262-8271.
- Wong, S. J., R. H. Boyle, V. L. Demarest, A. N. Woodmansee, L. D. Kramer, H. Li, M. Drebot, R. A. Koski, E. Fikrig, D. A. Martin y P. Y. Shi.** 2003. Immunoassay targeting nonstructural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue and St. Louis encephalitis virus infections and from flavivirus vaccination. *J Clin Microbiol* **41**:4217-4223.

- Wong, S. J., V. L. Demarest, R. H. Boyle, T. Wang, M. Ledizet, K. Kar, L. D. Kramer, E. Fikrig y R. A. Koski.** 2004. Detection of human anti-flavivirus antibodies with a west Nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay. *J Clin Microbiol* **42**:65-72.
- Zak, I. T., D. Altinok, J. R. Merline, S. Chander y K. K. Kish.** 2005. West Nile virus infection. *AJR Am J Roentgenol* **184**:957-961.



Anexo 1
Protocolo del Virus del oeste del Nilo
Hoja de Recolección de Datos

Fecha: _____

DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

No proyecto VON _____

Nombre: _____

Procedencia: _____ # expediente: _____

Fecha de Ingreso: _____ Médico responsable: _____

Sexo: M F Fecha de Nacimiento: _____

Estado de Nacimiento: _____ Edad: Años: _____ Meses: _____ Días: _____

Domicilio: _____

Teléfono: _____ Teléfono Opcional: _____

Fecha de primer contacto con los servicios de salud como caso probable de infección por el Virus del oeste del Nilo: _____

Diagnostico Probable: _____ Diagnostico Final: _____

DATOS EPIDEMIOLOGICOS

PROCEDENCIA. Local _____ Foráneo: _____

Estado Civil: _____ Escolaridad: _____ Ocupación: _____

Ha visitado otros lugares en las ultimas 2 semanas SI NO en el ultimo mes SI NO

Lugares Visitados: País: _____

Contacto con animales: Mosco _____ Chinche _____ Garrapata _____ Otros _____

Existen enfermos similares en la localidad _____ Ha recibido transfusiones sanguíneas: SI NO

Antecedentes de muertes inusuales de animales _____ Equino: _____ Ave: _____ Otro: _____

Antecedentes de Infección por el Virus del Dengue: SI NO Transfusiones: SI NO

CUADRO CLINICO

Fiebre: <input type="checkbox"/>	Fotofobia: <input type="checkbox"/>	Alteraciones del gusto: <input type="checkbox"/>	Rigidez del cuello: <input type="checkbox"/>
Cefalea: <input type="checkbox"/>	Dolor Abdominal: <input type="checkbox"/>	Adenomegalia: <input type="checkbox"/>	Estupor: <input type="checkbox"/>
Mialgia: <input type="checkbox"/>	Diarrea: <input type="checkbox"/>	Induración: <input type="checkbox"/>	Desorientación: <input type="checkbox"/>
Artralgias: <input type="checkbox"/>	Rinitis: <input type="checkbox"/>	Inflación del parpado: <input type="checkbox"/>	Temblores: <input type="checkbox"/>
Dolor retroocular: <input type="checkbox"/>	Conjuntivitis: <input type="checkbox"/>	Disnea: <input type="checkbox"/>	Convulsiones: <input type="checkbox"/>
Exantema: <input type="checkbox"/>	Congestión nasal: <input type="checkbox"/>	Alteraciones cardiacas: <input type="checkbox"/>	Parálisis: <input type="checkbox"/>
Prurito: <input type="checkbox"/>	Tos: <input type="checkbox"/>	Nódulos: <input type="checkbox"/>	Debilidad muscular: <input type="checkbox"/>
Vomito: <input type="checkbox"/>	Faringitis: <input type="checkbox"/>	Úlceras: <input type="checkbox"/>	Otitis: <input type="checkbox"/>
Nauseas: <input type="checkbox"/>	Hepatomegalia: <input type="checkbox"/>	Lesiones memb mucosa: <input type="checkbox"/>	Otras: <input type="checkbox"/>
Escalofríos: <input type="checkbox"/>	Esplenomegalia: <input type="checkbox"/>	Ictericia: <input type="checkbox"/>	_____

ESCAPE DE LÍQUIDOS:

HEMORRAGIAS:

Fecha de inicio de signos y síntomas: _____

Petequias: Derrame pleural:

Equimosis: Epistaxis:

Hematomas: Hematemesis:

Torniquete positivo: Melena:

Ascitis: Otras: _____

Gingival:

Fue Hospitalizado: SI NO

Anexo 2
Carta de Consentimiento
Proyecto del Virus del Oeste del Nilo

Las infecciones por el Virus del Dengue y el Virus del Oeste del Nilo son un problema de salud muy importante en todo el mundo. En nuestro medio no contamos con información de que tan extendida esta la enfermedad. Si consideramos que una persona que esta infectada, puede no saberlo por no presentar ninguna sintomatología, es importante hacer estudios en sangre y líquido cefalorraquídeo que nos pueda indicar si una persona tiene o no estos virus, lo que facilitaría un diagnostico temprano y la posibilidad de referirla al médico adecuado para su tratamiento.

Procedimiento del estudio.

Durante la visita se le tomara la muestra de sangre o de líquido cefalorraquídeo para hacer en dicha muestra los estudios para identificar el Virus del Dengue y el Virus del Oeste del Nilo. En caso de a usted se le solicite obtención de líquido cefalorraquídeo, se tomará una pequeña muestra de la misma para la identificación del virus. No será necesaria la interrupción de los tratamientos que este recibiendo en ese momento.

Riesgos asociados al estudio.

Los riesgos de estas pruebas son muy raros y no ponen en peligro la vida del paciente. El mayor riesgo podría ser algún moretón en el sitio de extracción de la muestra de sangre.

Beneficios que aportara el estudio al paciente.

Inmediatos: Realización de pruebas diagnosticas para el Virus del Dengue y el Virus del Oeste de Nilo de manera gratuita.

Mediatos: De acuerdo a los resultados, el médico tratante podría elegir los medicamentos adecuados y así, el paciente tiene mayores posibilidades de mejorar.

Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación que solicite en cualquier momento del desarrollo de la misma. Además, entiendo que estoy en libertad de retirarme en le momento que lo desee y si tomara esta decisión no me afectara en futuros tratamientos que requiera en el Hospital Universitario.

Entiendo que la información obtenida de la investigación será manejada en forma confidencial y que en ningún momento se violara mi privacidad.

Además el Hospital Universitario de la U.A.N.L. estará en disposición de brindarme tratamiento medico o quirúrgico sin costo, en caso de que resultara dañado directamente por cualquiera de los procedimientos del proyecto de investigación, y en caso de daño permanente, tendré derecho a ser indemnizado de acuerdo al daño sufrido.

Responsables de la investigación:

Investigador Principal:

Dra. Ana Ma. Rivas Estilla

Investigadores asociados:

M.C. María de Lourdes Garza Rodríguez

Fecha: _____

Paciente.

Nombre: _____

Dirección: _____

Firma

Tutor o familiar directo.

Nombre: _____ Parentesco: _____

Dirección: _____

Firma

Testigo.

Nombre: _____

Dirección: _____

Firma

Testigo

Nombre: _____

Dirección: _____

Firma

Investigador: _____

Firma

Anexo 3

Fundamentos de las pruebas serológicas de ELISA

Detección de anticuerpos de tipo IgM anti-VON por ELISA

Fundamento de la prueba

En este ensayo los pozos de poliestireno están recubiertos con anti-anticuerpos específicos para IgM humana. Las muestras y testigos diluidos se incuban en los pozos, cuando el anticuerpo de tipo IgM esta presente en la muestra, se une a los anti- anticuerpos específicos anti-IgM humana fijados en los pozos. Las reacciones no específicas se remueven mediante lavados. Se agrega el antígeno recombinante del VON y se incuba la placa. Si el anticuerpo anti-VON de tipo IgM esta presente en la muestra, el antígeno del VON se une a los anticuerpos anti-VON de tipo IgM fijados en el pocillo. El antígeno del VON no unido se elimina mediante lavados, posteriormente a los pozos se agregan los anticuerpos de ratón anti-*Flavivirus* conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRPO) y se incuban. Si el antígeno del VON fue retenido en el pocillo por los anticuerpos anti-*Flavivirus* en la muestra, entonces los anticuerpos de ratón anti-*Flavivirus*-HRPO quedan unidos a los antígenos del VON. El exceso de conjugado se remueve con el amortiguador de lavado. Posteriormente se agregan el sustrato enzimático (peróxido de hidrógeno (H₂O₂)) y el cromógeno (tetrametilbencidina (TMB)), y se desarrolla el color. Después se agrega el reactivo de la solución bloqueadora, el cambio de color obtenido se cuantifica mediante lectura espectrofotométrica de la Densidad Óptica (DO) a 450 nm. Las lecturas de la DO de la muestra se compararon con las lecturas de DO de referencia para el nivel de corte (cut-off) para así determinar los resultados.

En cada uno de los ensayos realizados se incluyeron testigos negativos (N), testigos positivos (P) y calibradores de punto de corte por triplicado (CO).

Detección de anticuerpos de tipo IgG anti-el VON por ELISA

Fundamento de la prueba

En este ensayo los pozos de poliestireno están recubiertos con antígeno recombinante del VON. Las muestras y testigos diluidos son incubados en los pozos para permitir que los anticuerpos de tipo IgG anti-el VON (si están presentes en la muestra) reaccionen con el antígeno fijado a los

pozos. Las reacciones no específicas son removidas mediante lavados de los pozos y después se agrega el conjugado (anticuerpos anti-IgG humana-peroxidasa) para que reaccione con los anticuerpos de tipo IgG humanos unidos al antígeno. El exceso de conjugado es removido mediante lavados. Posteriormente son agregados el sustrato enzimático (H_2O_2) y el cromógeno (TMB), y se desarrolla color. Después se agrega el reactivo de la solución bloqueadora, el cambio de color obtenido se cuantifica mediante lectura espectrofotométrica de la DO a 450 nm. Las lecturas de la DO de la muestra se comparan con las lecturas de DO de referencia para el nivel de corte (cut-off) para así determinar los resultados.

Los reactivos utilizados se conservan en refrigeración ($4^{\circ}C$) y antes de comenzar con el ensayo se mantiene a temperatura ambiente para asegurar que al utilizarlos alcancen la temperatura de entre 20 a $25^{\circ}C$. En cada uno de los ensayos realizados se analizaron testigos negativos (N), testigos positivos (P) y calibradores de punto de corte por triplicado (CO).

Detección de anticuerpos de tipo IgM anti-VD por ELISA

Fundamento de la prueba

En este ensayo cuando los anticuerpos de tipo IgM se encuentran presentes en el suero, se unen a los anticuerpos anti-IgM humanos unidos a la superficie de poliestireno de las tiras de pozos de la placa. Una mezcla concentrada de los antígenos 1, 2, 3 y 4 del VD se diluye con el diluyente del antígeno, y se añade al antígeno diluido un volumen igual de anticuerpo monoclonal (AcMo) conjugado con peroxidasa (HRP); permitiéndose así la formación de complejos antígeno-AcMo-HRP. El suero residual se elimina de la microplaca por lavados y se añaden los complejos antígeno-AcMo-HRP. Después de la incubación, los pozos se lavan y se añade un sistema de sustrato incoloro (TMB/ H_2O_2). El sustrato se hidroliza por la enzima y el cromógeno cambia a color azul. Después de parar la reacción con ácido, el TMB cambia a amarillo, el cambio de color obtenido se cuantifica mediante lectura espectrofotométrica de la DO a 450 nm. Las lecturas de DO de las muestras se comparan con las lecturas de DO de referencia para el nivel de corte (cut-off) para así determinar los resultados (presencia de anticuerpos específicos de tipo IgM anti-VD en la muestra en estudio).

Los reactivos utilizados se conservan en refrigeración (4°C) y antes de comenzar con el ensayo se mantiene a temperatura ambiente para asegurar que al utilizarlos alcancen la temperatura de entre 20 a 25°C. En cada uno de los ensayos realizados se analizaron testigos negativos (N), testigos positivos (P) y calibradores de punto de corte por triplicado (CO).

Detección de anticuerpos de tipo IgG anti-VD por ELISA

Fundamento de la prueba

En este ensayo cuando los anticuerpos anti-VD están presentes en el suero, se unen a una combinación de antígenos del dengue que se encuentran adheridos a la superficie de los pozos de poliestireno de las tiras del ensayo. El suero residual se elimina por medio de lavados y se añade anti-IgG HRP. Los pozos se lavan y se añade un sistema de sustrato incoloro TMB/H₂O₂, el sustrato se hidroliza por acción de la enzima y el cromógeno cambia a color azul. Después de interrumpir la reacción con ácido, el TMB cambia a color amarillo, el cambio de color obtenido se cuantifica mediante lectura espectrofotométrica de la DO a 450 nm. Las lecturas de la DO de las muestras se comparan con las lecturas de DO de referencia para el nivel de corte (cut-off) para así determinar los resultados (presencia de anticuerpos de tipo IgG anti-VD en la muestra en estudio). En cada uno de los ensayos realizados se incluyeron testigos negativos (N), testigos positivos (P) y calibradores de punto de corte por triplicado.

Anexo 4

Análisis de secuencias nucleotídicas para el diseño de oligonucleótidos y sondas Taq Man

Fragmento de el alineamiento de secuencias nucleotídicas del genoma del VON en el programa ClustalW2.

Se muestra un fragmento de la proteína E y los números de acceso de las secuencias alineadas. En rojo se muestra la región del genoma en donde se alinean los oligonucleótidos y en azul se muestra la región en donde se alinea la sonda Taq Man.

No de Acceso	Secuencia	
AY842931.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AF260967.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AF404754.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AY712946.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AY712945.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AY712948.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AY712947.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AY795965.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AY646354.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACTATGGGA	1200
AY660002.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AF404755.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AF404756.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AF206518.2	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1182
AF404753.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AF196835.2	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AY289214.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGGCCATGGGA	1200
AF481864.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AY278441.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACCATGGGA	1200
AY277252.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGTGATCTCTCCACCAAAGCTGCATGCCCGACCATGGGA	1200
AF260969.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGTGATCTCTCCACCAAAGCTGCATGCCCGACCATGGGA	1200
AF404757.1	TATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCATGCCCGACCATGGGA	1200
AY490240.2	TATTGCTATCTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACTATGGGA	1200
AF260968.1	TATTGCTATCTGGCCACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACTATGGGA	1200
AY603654.1	TACTGCTATCTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCCGACTATGGGA	1200
	** ***** **** ***** ***** ***** ***** ***** * *****	
AY842931.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260
AF260967.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260
AF404754.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260
AY712946.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260
AY712945.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260
AY712948.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260
AY712947.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260
AY795965.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260
AY646354.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260
AY660002.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260
AF404755.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260
AF404756.1	GAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC	1260

```

AF206518.2    GAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC 1242
AF404753.1    GAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC 1260
AF196835.2    GAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC 1260
AY289214.1    GAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC 1260
AF481864.1    GAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC 1260
AY278441.1    GAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC 1260
AY277252.1    GAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTGATCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC 1260
AF260969.1    GAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTGATCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC 1260
AF404757.1    GAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC 1260
AY490240.2    GAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAAACAAGGAGTAGTGGAC 1260
AF260968.1    GAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGTAAACAAGGAGTAGTGGAC 1260
AY603654.1    GAAGCTCACAAATGACAAAGCGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAAACAAGGAGTGGTGGAC 1260
*****

AY712946.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AY712945.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AY712948.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AY712947.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AY795965.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AY646354.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AY660002.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AF404755.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGATATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AF404756.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGATATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AY842931.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AF260967.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AF404754.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AF196835.2    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AF206518.2    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1302
AF404753.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AY289214.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AF481864.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AY278441.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AY277252.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGGCTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AF260969.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGGCTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AF404757.1    AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AY490240.2    AGAGGTTGGGGCAACGGCTGTGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
AF260968.1    AGGGGTTGGGGCAACGGCTGTGGACTATTTGGTAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAA 1320
** ** ***** ** ***** *****

```

Se muestra un fragmento de la región 3'UTR del genoma del VON y los números de acceso de las secuencias alineadas. En rojo se muestra la región del genoma en donde se alinean los oligonucleótidos y en azul se muestra la región en donde se alinea la sonda Taq Man.

```

AY842931.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AF260967.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AF404754.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AY712946.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AY712945.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AY712948.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AY712947.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AY795965.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AY646354.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10680
AY660002.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AF404755.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AF404756.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AF206518.2      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10661
AF404753.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AF196835.2      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AY289214.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AF481864.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AY278441.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AY277252.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AF260969.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AF404757.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AY490240.2      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AF260968.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
AY603654.1      CCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTA 10679
*****

AY712946.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AY712945.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AY712948.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AY712947.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AY795965.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AY646354.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10740
AY660002.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AF404755.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AF404756.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AY842931.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AF260967.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AF404754.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AF196835.2      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AF206518.2      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10721
AF404753.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AY289214.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AF481864.1      CCGC GTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AY278441.1      CCGC GTGCCACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AY277252.1      CCGT GTGCCACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AF260969.1      CCGT GTGCCACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AF404757.1      CCGC GTGCCACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AY490240.2      CTGC GTGCCACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
AF260968.1      CCGC GTGCCACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAAC 10739
* * *****

```

Anexo 5

Purificación de productos Amplificados

Protocolo de purificación de los productos amplificados de las secuencias de la proteína E y de la región 3'UTR del VON para clonación en el vector pCR-XL-TOPO 3.5. Se utilizó el estuche Wizard SV Gel and PCR Clean Up (Promega Corporation. Madison, WI, EUA)

Protocolo:

1. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 1%, en cada carril se agregaron 20 μ l de cada producto amplificado y se corrieron a un voltaje de 80 Volts.
2. Una vez que el gel corrió en tres cuartas partes se procedió a teñir el gel durante 5 min en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5 μ g/mL.
3. El gel se observó en una lámpara de luz UV y se cortaron las bandas correspondientes de los productos amplificados.
4. Para disolver el gel de agarosa se siguieron los siguientes pasos.
 - a. La banda de producto amplificado contenida en el gel de agarosa se colocó en un microtubo de 1.5 mL.
 - b. Se agregaron 10 μ L de la solución Membrane Binding por cada 10 mg de peso de la banda en el gel de agarosa.
 - c. La mezcla se agitó al vórtex durante 1 min y se incubó a 65°C hasta que el gel se disolviera.
5. Unión del producto amplificado a la columna.
 - a. La columna se colocó en un microtubo de 1.5 mL.
 - b. La mezcla del gel disuelto se colocó en la columna.
 - c. Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente.
 - d. La columna se centrifugó a 14,000 rpm y se descartó el filtrado.
 - e. La columna se colocó en un tubo nuevo.
6. Lavado de la columna.
 - a. Se agregaron 700 μ L de la Solución de Lavado a la columna.
 - b. La columna se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min.
 - c. El filtrado se descartó y se colocó la columna en un tubo nuevo.

- d. Se agregaron 500 μL de la solución de lavado, se centrifugó a 14,000 durante 1 min y se repitió una segunda centrifugación a la misma velocidad y descartando el filtrado en los dos pasos.
7. Elución del producto amplificado.
- a. La columna se transfirió a un microtubo nuevo y se agregaron 50 μL de agua ultrapura.
 - b. Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente.
 - c. Se centrifugó a 16, 000 rpm durante 1 min.
 - d. La columna se descartó y el filtrado que contenía el producto amplificado se conservó a -20°C hasta su uso para la secuenciación.

Anexo 6

Protocolo de purificación de DNA plasmídico

Para purificar las clonas que contenían fragmentos de las regiones de la proteína E y la región 3'UTR del genoma del VON se utilizó el estuche comercial Plasmid Midi Kit de QUIAGEN para mediana escala.

Protocolo:

1. Se sembró una colonia de bacterias (*E. coli* XL blue) en 3 mL de medio LB con tetraciclina y se incubó durante 8 horas en agitación a 300 rpm a 37°C.
2. Se diluyeron 50 µL de las bacterias en LB en 25 mL de medio LB selectivo. Se mantuvieron en agitación (300 rpm) a 37°C durante 16 horas.
3. Los 25 mL de medio LB se centrifugaron a 3,500 rpm durante 15 min a 4°C.
4. El sobrenadante se eliminó y el botón de bacterias se resuspendió en 4 mL de buffer P1.
5. Se agregaron 4 mL de buffer P2, la mezcla se agitó vigorosamente invirtiendo el tubo 6 veces y se incubó a temperatura ambiente (15-25°C) durante 5 min.
6. Se agregaron 4 mL de buffer P3, se mezcló inmediatamente y agitando vigorosamente invirtiendo el tubo 6 veces. Se incubó en hielo durante 15 min.
7. La muestra se centrifugó a 3,500 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante que contenía el plásmido se transfirió a un tubo estéril.
8. El sobrenadante se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo.
9. Las columnas QIAGEN-tip 100 se equilibraron agregándoles 4 mL de buffer QBT y permitiendo que el buffer se vaciara de la columna por gravedad.
10. El sobrenadante que contenía el plásmido se transfirió a la columna y se dejó que entrara a la resina de la columna por gravedad.
11. Se realizaron dos lavados de la columna utilizando en cada uno 10 mL de buffer QC.
12. EL DNA plasmídico se eluyó con 5 mL del buffer QF.
13. El DNA plasmídico se precipitó agregando 3.5 mL de isopropanol. La muestra se mezcló y se centrifugó a 3,000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se descartó con cuidado sin desprender la pastilla.

14. La pastilla de DNA plasmídico se lavó con 2 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó con cuidado sin desprender la pastilla.
15. La pastilla de DNA plasmídico se secó al aire durante 10 min y se resuspendió en 250 μ L de agua ultra pura.

Anexo 7

Análisis de secuencias nucleotídicas

Resultados de la comparación de la secuencia de la clona de la proteína E del VON con las secuencias reportadas en el Banco de genes.

Sequences producing significant alignments:

(Click headers to sort columns)

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
AF335419.3	Cloning vector pPGKneo-I, complete sequence	421	538	57%	1e-114	98%
U14118.1	Cloning vector pSG930, HIS4-based plasmid, complete sequence	419	534	57%	5e-114	98%
AJ783967.1	Mycobacterium sp. HXN-1500 operon (ahpGHI genes)	417	520	55%	2e-113	98%
Y10545.1	Cloning vector pZeRO-2T	416	529	57%	6e-113	98%
DQ666465.1	VON isolate RMS4-2003 polyprotein precursor, gene, partial cds	385	385	40%	1e-103	98%
DQ431703.1	VON isolate 04-218CO polyprotein precursor, gene, complete cds	385	385	40%	1e-103	98%
DQ431701.1	VON isolate 04-214CO polyprotein precursor, gene, complete cds	385	385	40%	1e-103	98%
DQ431695.1	VON isolate 03-82IL polyprotein precursor, gene, complete cds	385	385	40%	1e-103	99%
DQ874460.1	VON isolate IL2004VeCr envelope protein gene, partial cds	385	385	40%	1e-103	99%
DQ874408.1	VON isolate IL2005Co01Cr envelope protein gene, partial cds	385	385	40%	1e-103	99%
DQ912013.1	VON isolate 04-215 envelope gene, partial cds	385	385	40%	1e-103	98%
DQ912012.1	VON isolate 04-214 envelope gene, partial cds	385	385	40%	1e-103	98%
DQ911981.1	VON isolate 04-218 envelope gene, partial cds	385	385	40%	1e-103	98%
DQ911960.1	VON isolate 03-082 envelope gene, partial cds	385	385	40%	1e-103	99%
DQ911877.1	VON isolate 03-018 envelope gene, partial cds	385	385	40%	1e-103	98%
AY369419.1	VON strain 02003688 envelope glycoprotein gene, partial cds	385	385	40%	1e-103	99%
EU155484.1	VON strain OK03, complete genome	381	381	40%	1e-102	99%
EF657887.1	VON strain 3356K VP2, complete genome	381	381	40%	1e-102	99%
EF530047.1	VON strain 3356.2.1.1, complete genome	381	381	40%	1e-102	99%
EF205433.1	VON strain M12357 polyprotein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
EF205432.1	VON strain M12251 polyprotein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
EF205431.1	VON strain M12214 polyprotein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
EF205430.1	VON strain M11769 polyprotein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
EF205427.1	VON strain Bird 5014 polyprotein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
EF205426.1	VON strain Bird 5001 polyprotein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
EF205425.1	VON strain Bird 4487 polyprotein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
EF205424.1	VON strain Bird 4276 polyprotein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
EF205423.1	VON strain Bird 4486 polyprotein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
EF205422.1	VON strain Bird 4511 polyprotein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
EF205421.1	VON strain M8977 polyprotein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874469.1	VON isolate IL2004Co05Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874468.1	VON isolate IL2004Co04Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874466.1	VON isolate IL2004Co03Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874465.1	VON isolate IL2004Co02Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874464.1	VON isolate IL2004FaBj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874462.1	VON isolate IL2004WIBj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874461.1	VON isolate IL2004Co01Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874458.1	VON isolate IL2003BoBj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874457.1	VON isolate IL2003DkCr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874456.1	VON isolate IL2003CoCr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874455.1	VON isolate IL2003Ch02Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874454.1	VON isolate IL2003PeBj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874453.1	VON isolate IL2003Ch01Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874452.1	VON isolate IL2003MICr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874449.1	VON isolate IL2002Co01Sq envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874445.1	VON isolate IL2002Co05Go envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874443.1	VON isolate IL2002CoMh envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874442.1	VON isolate IL2002Co03Go envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874441.1	VON isolate IL2002Co02Go envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874440.1	VON isolate IL2002Co01Go envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874438.1	VON isolate IL2002DoBj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874437.1	VON isolate IL2002GrCr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874436.1	VON isolate IL2002MaBj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874435.1	VON isolate IL2002Pe03Bj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
	cds					
DQ874434.1	VON isolate IL2002Pe01Bj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874433.1	VON isolate IL2002Pe02Bj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874432.1	VON isolate IL2002CIBj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874431.1	VON isolate IL2002CICr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874428.1	VON isolate IL2002CrBj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874427.1	VON isolate IL2002Co03Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874426.1	VON isolate IL2002Co02Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874424.1	VON isolate IL2002Co01Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874422.1	VON isolate IL2005Co02Sq envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874420.1	VON isolate IL2005HeBj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874419.1	VON isolate IL2005RfCr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874417.1	VON isolate IL2005Mh03Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874416.1	VON isolate IL2005La02Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874415.1	VON isolate IL2005WiCr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874414.1	VON isolate IL2005Co03Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874413.1	VON isolate IL2005Mh01Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874412.1	VON isolate IL2005Mh02Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874411.1	VON isolate IL2005KeBj envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874410.1	VON isolate IL2005La01Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874409.1	VON isolate IL2005Co02Cr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874407.1	VON isolate IL2005KaCr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874406.1	VON isolate IL2005ScCr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874405.1	VON isolate IL2005DuCr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874404.1	VON isolate IL2005RiCr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874403.1	VON isolate IL2005LaCr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ874402.1	VON isolate IL2005LeCr envelope protein gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912021.1	VON isolate 04-247 envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912018.1	VON isolate 04-237 envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
DQ912017.1	VON isolate 04-235 envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912016.1	VON isolate 04-229 envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912014.1	VON isolate 04-216 envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912011.1	VON isolate 04-213 envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912010.1	VON isolate 03-003CAN envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912009.1	VON isolate 03-016CAN envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912008.1	VON isolate 03-015CAN envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912007.1	VON isolate 03-014CAN envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912006.1	VON isolate 03-013CAN envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912005.1	VON isolate 03-011CAN envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912004.1	VON isolate 03-010CAN envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912003.1	VON isolate 03-009CAN envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912002.1	VON isolate 03-008CAN envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%
DQ912001.1	VON isolate 03-007CAN envelope gene, partial cds	381	381	40%	1e-102	99%

Resultados de la comparación de la secuencia de la clona de la región 3'UTR del genoma del VON con las secuencias reportadas en el Banco de genes.

Sequences producing significant alignments:

(Click headers to sort columns)

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
EU249803.1	VON strain 68856, complete genome	338	338	100%	6e-90	97%
AM404308.1	VON strain PTRoxo complete genome, genomic RNA, strain PTRoxo	338	338	100%	6e-90	97%
EU081844.1	VON strain Egypt 101, complete genome	338	338	100%	6e-90	97%
AY490240.2	VON strain Chin-01, complete genome	338	338	100%	6e-90	97%
AF260968.1	VON strain Eg101, complete genome	338	338	100%	6e-90	97%
AJ965629.2	VON strain PT6.5 partial polyprotein, genomic RNA	333	333	100%	2e-88	96%
AJ965626.2	VON strain PT6.16 polyprotein, genomic RNA	333	333	100%	2e-88	96%
DQ118127.1	VON isolate goose-Hungary/03, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ411035.1	VON isolate Ast02-2-692, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ411034.1	VON isolate Ast02-2-691, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ411033.1	VON isolate Ast02-3-165, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ411032.1	VON isolate Ast02-3-146, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ411031.1	VON isolate Ast01-187, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ411030.1	VON isolate Ast01-182, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
AY262283.1	VON isolate KN3829 polyprotein gene, complete cds	333	333	100%	2e-88	96%
DQ377180.1	VON isolate Ast02-3-208, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ377179.1	VON isolate Ast02-2-298, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ377178.1	VON isolate Ast02-2-26, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ374653.1	VON isolate Ast02-2-25, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ374652.1	VON isolate Ast04-2-824A,, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ374651.1	VON isolate Ast02-3-570, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
DQ374650.1	VON isolate Ast02-3-717, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
AF196542.1	VON isolate HB6343 polyprotein gene, partial cds	333	333	100%	2e-88	96%
AF196541.1	VON isolate ArTB3573 polyprotein gene, partial cds	333	333	100%	2e-88	96%
AY278441.1	VON isolate Ast99-901, complete genome	333	333	100%	2e-88	96%
AF017254.2	VON nonstructural protein NS5 (NS5) gene, partial cds	333	333	100%	2e-88	96%
AY701413.1	VON strain 04.05 polyprotein gene, complete cds	333	333	100%	2e-88	96%
FJ483549.1	VON strain 15803, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
FJ483548.1	VON strain 15217, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
FJ411043.1	VON isolate NY99iso-1, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
FJ151394.1	VON strain NY99-crow-V76/1, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
EU155484.1	VON strain OK03, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
EF657887.1	VON strain 3356K VP2, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
DQ983578.1	VON strain FLO3-FL2-3, partial genome	329	329	100%	3e-87	96%

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
EF530047.1	VON strain 3356.2.1.1, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
DQ666452.1	VON isolate BSL2-2005, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
DQ666451.1	VON isolate BSL13-2005, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
DQ666450.1	VON isolate GCTX2-2005, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
DQ666449.1	VON isolate GCTX1-2005, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
DQ666448.1	VON isolate BSL5-2004, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
DQ786573.1	VON isolate France 407/04 polyprotein gene, complete cds	329	329	100%	3e-87	96%
DQ786572.1	VON isolate France 405/04 polyprotein gene, complete cds	329	329	100%	3e-87	96%
EF571854.1	VON strain 385-99, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
DQ431710.1	VON isolate 04-244CA polyprotein precursor, gene, complete cds	329	329	100%	3e-87	96%
DQ431706.1	VON isolate 04-236NM polyprotein precursor, gene, complete cds	329	329	100%	3e-87	96%
DQ431705.1	VON isolate 04-233ND polyprotein precursor, gene, complete cds	329	329	100%	3e-87	96%
DQ411029.1	VON isolate Ast01-66, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
AY660002.1	VON isolate Mex03 from Mexico, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
AY848696.2	VON strain 385-99 isolate hamster passage strain 9317E, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
AY848695.2	VON strain 385-99 isolate hamster passage strain 9317A, complete genome	329	329	100%	3e-87	96%
AY369402.1	VON strain 02003944 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%
AY369401.1	VON strain 02003688 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%
AY369400.1	VON strain 02003654 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%
AY369398.1	VON strain 02003535 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%
AY369397.1	VON strain 02003204 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%
AY369396.1	VON strain 02003011 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%
AY369395.1	VON strain 02002868 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%
AY369394.1	VON strain 02002831 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%
AY369393.1	VON strain 02002771 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%
AY369392.1	VON strain 02002758 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%
AY369391.1	VON strain 02002735 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%
AY369390.1	VON strain 02002684 3' noncoding region, partial sequence	329	329	100%	3e-87	96%

Anexo 8

Resultados de las pruebas serológicas de PNRP.

Se realizaron diluciones de las muestras de los pacientes y se analizaron en cultivo viral. En cada muestra se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes en contra de diferentes flavivirus (VON, VD-1, VD-2, VD-3, VD-4 y el VESL). Los resultados numéricos muestran la mayor dilución a la cual los sueros presentaban anticuerpos neutralizantes en contra de los virus a los que fueron expuestos.

No.	VON	VESL	VD-1	VD-2	VD-3	VD-4	Diagnostico	PRNT diagnosis
1	< 20	< 20	40	160	20	20	Donador de sangre	VD-2
2	< 20	< 20	320	40	20	20	Donador de sangre	VD-1
3	20	< 20	160	40	20	40	Donador de sangre	VD-1
4	< 20	< 20	40	160	20	20	Donador de sangre	VD-2
5	< 20	< 20	160	40	< 20	20	Donador de sangre	VD-1
6	20	< 20	160	80	40	40	Donador de sangre	VD (serotipo desconocido)
7	< 20	< 20	320	20	40	40	Donador de sangre	VD-1
8	< 20	< 20	320	40	40	40	Donador de sangre	VD-1
9	< 20	< 20	160	40	20	40	Donador de sangre	VD-1
10	20	< 20	320	20	20	80	Donador de sangre	VD-1
11	20	< 20	640	40	20	40	Donador de sangre	VD-1
12	40	20	320	160	80	80	Donador de sangre	VD (serotipo desconocido)
13	160	20	20	< 20	< 20	20	Donador de sangre	VON
14	< 20	< 20	160	40	20	40	Donador de sangre	VD-1
15	320	20	20	< 20	< 20	20	Donador de sangre	VON
16	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	Donador de sangre	Negativo
17	< 20	< 20	320	80	40	40	Donador de sangre	VD-1
18	< 20	< 20	640	40	40	40	Donador de sangre	VD-1
19	< 20	< 20	40	< 20	< 20	20	Donador de sangre	DEN (serotipo desconocido)
20	20	< 20	320	160	40	80	Donador de sangre	VD (serotipo desconocido)
21	20	< 20	80	160	80	80	Donador de sangre	VD (serotipo desconocido)
22	< 20	< 20	640	80	40	80	Pacientes febriles	VD-1
23	< 20	< 20	80	< 20	20	20	Pacientes febriles	VD-1
24	640	320	20,480	10,240	2,560	10,240	Dengue Confirmado	Infección secundaria
25	640	80	20,480	5,120	640	1,280	Dengue Confirmado	Infección secundaria
26	5,120	80	20,480	10,240	1,280	5,120	Dengue Confirmado	Infección secundaria
27	80	< 20	2,560	1,280	80	80	Dengue Confirmado	Infección secundaria
28	< 20	< 20	40	160	< 20	20	Dengue Confirmado	VD-2
29	5,120	80	10,240	5,120	2,560	5,120	Dengue Confirmado	Infección secundaria
30	320	80	10,240	2,560	640	20,480	Dengue Confirmado	Infección secundaria
31	1,280	160	5,120	10,240	2,560	10,240	Dengue Confirmado	Infección secundaria

32	1,280	1280	5,120	2,560	320	1,280	Dengue Confirmado	Infección secundaria
33	10,240	640	10,240	10,240	1,280	20,480	Pacientes febriles	Infección secundaria
34	20	20	640	80	80	80	Dengue Confirmado	VD-1
35	320	160	1280	640	80	640	Dengue Confirmado	Infección secundaria
36	1,280	160	10,240	20,480	1,280	20,480	Dengue Confirmado	Infección secundaria
37	40	< 20	320	160	80	80	Dengue Confirmado	VD (serotipo desconocido)
38	640	40	10,240	5,120	1,280	2,560	Dengue Confirmado	Infección secundaria
39	20	< 20	640	80	80	80	Pacientes febriles	VD-1
40	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	Dengue Confirmado	Negativo
41	640	40	20,480	5,120	640	1,280	Dengue Confirmado	Infección secundaria
42	20	< 20	160	640	80	160	Dengue Confirmado	VD-2
43	1,280	5,120	20,480	40,960	5,120	10,240	Dengue Confirmado	Infección secundaria
44	80	40	20,480	40,960	320	640	Dengue Confirmado	Infección secundaria
45	< 20	20	640	40	40	40	Dengue Confirmado	VD-1
46	20	40	640	40	40	20	Dengue Confirmado	VD-1
47	5,120	320	10,240	10,240	2,560	2,560	Dengue Confirmado	Infección secundaria
48	320	160	5,120	5,120	1,280	2,560	Dengue Confirmado	Infección secundaria
49	160	80	10,240	5,120	640	2,560	Dengue Confirmado	Infección secundaria
50	20	< 20	320	40	20	80	Dengue Confirmado	VD-1
51	< 20	20	320	80	40	80	Dengue Confirmado	VD-1
52	< 20	< 20	80	640	< 20	40	Pacientes febriles	VD-2
53	< 20	< 20	80	40	20	40	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
54	< 20	< 20	320	20	< 20	80	Pacientes febriles	VD-1
55	< 20	< 20	160	20	20	< 20	Pacientes febriles	VD-1
56	< 20	< 20	320	40	20	20	Pacientes febriles	VD-1
57	< 20	< 20	160	320	20	160	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
58	20	< 20	160	640	80	80	Pacientes febriles	VD-2
59	< 20	< 20	80	160	< 20	80	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
60	< 20	< 20	320	20	< 20	20	Pacientes febriles	VD-1
61	< 20	< 20	320	40	20	80	Pacientes febriles	VD-1
62	< 20	< 20	20	80	20	20	Pacientes febriles	VD-2
63	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	Pacientes febriles	Negativo
64	< 20	< 20	40	320	< 20	20	Pacientes febriles	VD-2
65	20	< 20	640	320	40	320	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
66	20	< 20	40	320	20	20	Pacientes febriles	VD-2
67	160	20	< 20	< 20	< 20	< 20	Pacientes febriles	VON
68	< 20	< 20	640	80	40	20	Pacientes febriles	VD-1
69	< 20	< 20	320	40	20	20	Pacientes febriles	VD-1
70	20	< 20	640	80	40	40	Pacientes febriles	VD-1
71	20	< 20	160	640	80	80	Pacientes febriles	VD-2
72	20	< 20	320	160	40	80	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)

Estudio serológico y molecular del virus del oeste del Nilo en sujetos del noreste de México

M.C. María de Lourdes Garza Rodríguez

73	< 20	< 20	320	20	< 20	40	Pacientes febriles	VD-1
74	< 20	< 20	40	160	40	40	Pacientes febriles	VD-2
75	< 20	< 20	20	160	< 20	20	Pacientes febriles	VD-2
76	< 20	< 20	640	80	40	40	Pacientes febriles	VD-1
77	40	< 20	640	160	80	160	Pacientes febriles	VD-1
78	< 20	< 20	20	80	< 20	20	Pacientes febriles	VD-2
79	20	< 20	640	80	20	20	Pacientes febriles	VD-1
80	20	< 20	80	40	20	160	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
81	20	< 20	320	160	40	80	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
82	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	Pacientes febriles	Negativo
83	< 20	< 20	320	80	< 20	40	Pacientes febriles	VD-1
84	< 20	< 20	80	320	20	40	Pacientes febriles	VD-2
85	80	20	< 20	< 20	< 20	< 20	Pacientes febriles	VON
86	< 20	< 20	160	80	< 20	40	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
87	20	< 20	320	80	20	80	Pacientes febriles	VD-1
88	< 20	< 20	320	80	20	40	Pacientes febriles	VD-1
89	< 20	< 20	320	80	< 20	< 20	Pacientes febriles	VD-1
90	< 20	< 20	40	160	< 20	20	Pacientes febriles	VD-2
91	< 20	20	320	80	40	20	Pacientes febriles	VD-1
92	< 20	< 20	320	80	40	80	Pacientes febriles	VD-1
93	< 20	< 20	640	80	40	20	Pacientes febriles	VD-1
94	< 20	< 20	640	160	160	160	Pacientes febriles	VD-1
95	< 20	< 20	20	80	20	20	Pacientes febriles	VD-2
96	20	< 20	320	160	80	80	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
97	< 20	< 20	320	80	40	20	Pacientes febriles	VD-1
98	< 20	< 20	320	160	40	80	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
99	< 20	< 20	640	40	20	20	Pacientes febriles	VD-1
100	< 20	< 20	640	40	40	20	Pacientes febriles	VD-1
101	< 20	< 20	320	160	80	20	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
102	160	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	Pacientes febriles	VON
103	20	< 20	20	80	< 20	< 20	Pacientes febriles	VD-2
104	40	< 20	160	1,280	< 20	160	Pacientes febriles	VD-2
105	< 20	< 20	< 20	40	< 20	< 20	Pacientes febriles	VD-2
106	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	Pacientes febriles	Negativo
107	< 20	< 20	80	20	20	< 20	Pacientes febriles	VD-1
108	20	< 20	160	80	< 20	< 20	Pacientes febriles	VD-1
109	20	< 20	320	80	80	40	Pacientes febriles	VD-1
110	20	< 20	640	160	80	40	Pacientes febriles	VD-1
111	40	< 20	320	40	40	40	Pacientes febriles	VD-1
112	20	< 20	40	320	40	40	Pacientes febriles	VD-2
113	40	20	320	80	160	40	Pacientes febriles	VD-1
114	20	< 20	20	160	40	< 20	Pacientes febriles	VD-2
115	640	20	20	40	< 20	20	Pacientes febriles	VON
116	20	< 20	320	40	160	20	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
117	20	< 20	40	160	40	40	Pacientes febriles	VD-2
118	2,560	80	10,240	5,120	2580	640	Pacientes febriles	Infección secundaria
119	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	Pacientes febriles	Negativo
120	20	< 20	640	80	40	20	Pacientes febriles	VD-1
121	< 20	< 20	160	80	40	40	Pacientes febriles	VD-1

122	40	20	320	160	40	80	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
123	20	< 20	320	40	40	40	Pacientes febriles	VD-1
124	40	< 20	320	80	40	160	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
125	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	Pacientes febriles	Negativo
126	20	< 20	320	80	20	80	Pacientes febriles	VD-1
127	20	40	320	80	40	160	Pacientes febriles	VD (serotipo desconocido)
128	< 20	< 20	320	40	40	40	Pacientes febriles	VD-1
129	< 20	< 20	640	80	40	20	Dengue Confirmado	VD-1
130	640	40	20,480	10,240	5,120	20,480	Dengue Confirmado	Infección secundaria
131	< 20	< 20	320	40	80	20	Dengue Confirmado	VD-1
132	5,120	80	10,240	20,480	20,480	20,480	Dengue Confirmado	Infección secundaria
133	640	320	10,240	10,240	2,560	10,240	Dengue Confirmado	Infección secundaria
134	20	20	640	160	160	80	Pacientes neurológicos	VD-1
135	<	< 20	160	40	20	< 20	Pacientes neurológicos	VD-1
136	20	< 20	160	40	40	40	Pacientes neurológicos	VD-1
137	20	40	640	80	80	80	Pacientes neurológicos	VD-1
138	20	< 20	80	320	80	80	Pacientes neurológicos	VD-2
139	20	< 20	160	320	160	160	Pacientes neurológicos	VD (serotipo desconocido)
140	20	20	640	80	80	160	Pacientes neurológicos	VD-1
141	20	< 20	640	80	40	80	Pacientes neurológicos	VD-1
142	80	80	640	320	80	160	Pacientes neurológicos	VD (serotipo desconocido)
143	< 20	< 20	80	20	< 20	20	Pacientes neurológicos	VD-1
144	20	20	640	160	20	160	Pacientes neurológicos	VD-1
145	20	< 20	640	160	40	160	Pacientes neurológicos	VD-1
146	40	20	160	320	80	160	Pacientes neurológicos	VD (serotipo desconocido)
147	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	Pacientes neurológicos	Negativo

Anexo 9

Resultados de los ensayos de sensibilidad para PCR en tiempo real empleando diluciones de los plásmidos de las regiones de la proteína E y 3'UTR del VON.

Resultados obtenidos en los ensayos correspondientes a la región de la Proteína E

Número de copias	Tipo de Muestra	CT	Desviación estándar	Log No Copias
3	Estándar	30.47	0.462	0.477121255
3	Estándar	30.01	0.466	0.477121255
3	Estándar	29.97	0.462	0.477121255
30	Estándar	29.55	0.462	1.477121255
30	Estándar	29.31	0.466	1.477121255
30	Estándar	29.12	0.466	1.477121255
300	Estándar	28.76	0.109	2.477121255
300	Estándar	28.66	0.109	2.477121255
300	Estándar	28.54	0.109	2.477121255
3000	Estándar	26.85	0.171	3.477121255
3000	Estándar	26.55	0.171	3.477121255
3000	Estándar	26.55	0.171	3.477121255
30000	Estándar	24.59	0.08	4.477121255
30000	Estándar	24.55	0.08	4.477121255
30000	Estándar	24.44	0.08	4.477121255
300000	Estándar	23.38	0.114	5.477121255
300000	Estándar	23.26	0.114	5.477121255
300000	Estándar	23.15	0.114	5.477121255
	Control negativo	34.25		
	Control negativo	34.29		
	Control negativo	34.73		

Resultados obtenidos en los ensayos correspondientes a la región 3'UTR.

Número de copias	Task	CT	Std. Dev. CT	Log Numero de Copias
3	Estándar	39.08	3.383	0.47712126
3	Estándar	34.29	3.383	0.47712126
3	Estándar			0.47712126
30	Estándar	36.01	0.426	1.47712126
30	Estándar	36.85	0.426	1.47712126
30	Estándar	36.31	0.426	1.47712126
300	Estándar	31.14	0.979	2.47712126
300	Estándar	33.03	0.979	2.47712126
300	Estándar	32.53	0.979	2.47712126
3000	Estándar	29.27	0.265	3.47712126
3000	Estándar	28.98	0.265	3.47712126
3000	Estándar	29.51	0.265	3.47712126
30000	Estándar	25.8	0.23	4.47712126
30000	Estándar	26.19	0.23	4.47712126
30000	Estándar	26.21	0.23	4.47712126
300000	Estándar	22.39	0.329	5.47712126
300000	Estándar	22.92	0.329	5.47712126
300000	Estándar	22.32	0.329	5.47712126
	Control Negativo			
	Control Negativo			
	Control Negativo			

Anexo 10
Productividad Científica

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

FOMIX-CONACYT Convocatoria Nuevo León 2003

Comité: Ciencias de la Salud

Proyecto: NL-2003-CO4-12553

Título Del Proyecto: Establecimiento del diagnostico y prevalencia del virus del Nilo en el noreste de mexico

Responsable técnico: Dra. Ana María Rivas Estilla

Institución: Universidad Autónoma de Nuevo León

PAICYT 2007.

Clave: SA1429-06.

Título del proyecto: _ Estudio de la prevalencia del Virus del Oeste del Nilo en el Noreste de México

Nombre del investigador: Dra. Ana María Rivas Estilla

ARTÍCULOS PUBLICADOS

1. **María de Lourdes Garza Rodríguez,** Miguel Ángel Reyes López, Ana María Rivas Estilla. **Impacto de las infecciones por Flavivirus en México.** Conversus. No. 65Pg 33-35. Noviembre de 2007.
2. **María de Lourdes Garza Rodríguez,** Diana Raquel Rodríguez Rodríguez, Bradley J. Blitvich, Miguel Á. Reyes López, Ildefonso Fernández Salas, Javier Ramos Jimenez, José A. Farfán Ale, Rogelio Cazares Tamez, César Martinez Longoria, Maria I. Tavitás Aguilar and Ana M. Rivas-Estilla. **Serologic surveillance for VON and other flaviviruses in febrile patients, encephalitic**

patients and asymptomatic blood donors in northern Mexico. Vector Borne and Zoonotic Diseases. Aceptado para publicación el 1 de marzo del 2009.

FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

Tesis de licenciatura dirigidas

1. Anahí Martínez Chavarría

Título de la tesis: **Análisis de la mutación delta-CCR5 en pacientes con infecciones por flavivirus**

Licenciatura de Químico Clínico Biólogo

Licenciatura de Químico Clínico Biólogo

Fecha de Inicio: 2 de Junio del 2006

Fecha del Examen: 6 de Junio de 2007

2. Diana Raquel Rodríguez Rodríguez

Título de la tesis: **Prevalencia de la Infección por virus del Dengue y Virus del Oeste del Nilo en donadores de sangre del Hospital Universitario José Eleuterio González**

Licenciatura de Químico Clínico Biólogo

Fecha de Inicio: Noviembre del 2006

Fecha del Examen: 3 de diciembre de 2007

La alumna Diana Raquel obtuvo mención honorífica por la investigación realizada para obtener su examen de grado.

RECONOCIMIENTOS

1. Reconocimiento por su participación como Profesora con el tema “Diagnóstico por el laboratorio molecular para enfermedades de transmisión sexuales” realizado en el VI Congreso Nacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio, Expolab Tampico 2006 otorgado por la Universidad Autónoma de Tamaulipas de la Fac. de Medicina de Tampico, del 28 al 30 de abril de 2006 en el Club Maeva Miramar, Tampico, Tamaulipas.

2. Reconocimiento por su participación como Coordinadora del XVIII Curso Internacional Teórico-Práctico “Herramientas proteómicas, Parte I: Principios Básicos y Aplicaciones” realizado en la Fac. de Medicina de la UANL del 9 al 13 de octubre del 2006.

ASISTENCIA A CONGRESOS NACIONALES

1. Simposio sobre los Virus de la Influenza. Cuerpo Académico Infectología, Hospital Universitario “José Eleuterio González”. Monterrey N.L. a 9 de septiembre de 2005.
2. XXIII Congreso nacional de Investigación Biomédica. Monterrey, N.L. 27-29 de Octubre de 2005.
3. XXX Congreso nacional de Genética Humana, Monterrey N.L. 16 al 19 de Noviembre de 2005.
4. Cátedra Nacional de Medicina “Dr. Ignacio Chávez 2006” Avances en Medicina Genómica. Con Valor Curricular de 2 Créditos Académicos Equivalentes a 20 horas de Ecuación Continua. Facultad de Medicina de la UANL. Monterrey N.L. del 20 al 24 de febrero de 2006.
5. IV Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular dentro del IV Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Morelia Michoacán, México. 4-7 de Abril de 2006.
6. VI Congreso Nacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio, Expolab Tampico 2006. Facultad de Medicina de la UAT. Federación Nacional de Colegios de la Química Clínica, A.C. y Colegio de Químicos Clínicos de Tamaulipas A.C. Tampico Tamaulipas 28 al 30 de Abril de 2006.
7. 1er. Foro Institucional de Formación de Investigadores, realizado en el Centro de Formación e Innovación Educativa del IPN, Instituto Politécnico Nacional el 18 de mayo del 2006.
8. XXXI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Realizada en Monterrey, N.L. del 12 al 15 de Julio del 2006.
9. Congreso Internacional y Exhibición de Biotecnología “BioMonterrey 06”, realizado en el Centro Internacional de Negocios en Monterrey, N.L. del 20 al 24 de septiembre del 2006.
10. V Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. Noviembre 28 al 1 de Diciembre del 2006. México D.F.
11. IV Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y V Jornadas Científicas del Posgrado en Biomedicina y Biotecnología Molecular. Llevadas a cabo en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del 23 al 27 de Abril de 2007. México D.F.
12. XII Congreso de Investigación en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca Morelos. 7 al 9 de Marzo del 2007.

13. XXIV Congreso Nacional de Investigación Biomédica y Horizontes de la Medicina. Llevado a cabo del 29 de agosto al 1 de septiembre de 2007. Monterrey N.L. México.
14. Encuentro Estatal de Investigación en Salud 2007. Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León. 29 y 30 de Noviembre de 2007.
15. V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y VI Jornadas Científicas del Posgrado en Biotecnología Molecular y Biomedicina. Llevadas a cabo en la Ciudad de Tuxtla Gutiérrez del 10 al 14 de marzo del 2008.
16. 13 Congreso de Investigación en Salud Pública. Llevado a cabo en la Ciudad de Cuernavaca Morelos del 3 al 6 de marzo del 2009.

ASISTENCIA A CONGRESOS INTERNACIONALES

1. 65th Annual Meeting “Two Nations, One Cause: Partners in Health”. South Padre Island, Texas, EUA. May 20th to the 22rd, 2007.

PARTICIPACIÓN COMO PROFESOR EN CURSOS Y CONGRESOS:

1. Participación como Ponente en la sesión general del Hospital 33 del IMSS con el tema “**Estudio de la Prevalencia del Virus del oeste del Nilo en el Noreste de México**”, llevada a cabo en la ciudad de Monterrey, N.L. el 9 de Noviembre de 2005.
2. Participación como Profesora con el tema “**Diagnóstico por el Laboratorio Molecular para Enfermedades de Transmisión Sexual**” en el VI Congreso Nacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio, Expolab Tampico 2006. Facultad de Medicina de la UAT. Federación Nacional de Colegios de la Química Clínica, A.C. y Colegio de Químicos Clínicos de Tamaulipas A.C. Tampico Tamaulipas el 30 de Abril de 2006.
3. Participación con la exposición del Seminario “**Diagnóstico del Virus del Oeste del Nilo en humanos**”. Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico nacional. Cd. Reynosa, Tamaulipas, México, a 17 de mayo de 2006.
4. Participación con la exposición del Seminario “**Establecimiento de la Prevalencia de la Enfermedad Producida por el Virus del Oeste del Nilo en el Noreste de México y Análisis de las Cepas circulantes del Virus**”. Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico nacional. Ciudad de Reynosa, Tamaulipas, México, a 21 de septiembre de 2005.

5. Participación como ponente en el “**V Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN**”, Noviembre 28 al 1 de Diciembre del 2006.
6. Se impartió el seminario “**Avances en el Establecimiento de diagnóstico y prevalencia del virus del Oeste del Nilo en el Noreste de México**”. Llevado a cabo dentro del ciclo de Seminarios de el Centro de Investigación Biomédica del IPN el día 5 de junio de 2007.
7. Intervención como ponente en el “**Curso Teórico/Práctico 2007: Técnicas y Herramientas para biología molecular básica**”. Del 11 al 15 de junio de 2007.
8. Profesor Invitado en el Seminario de Investigación de Posgrado con la presentación: “**ESTUDIO DE LA FRECUENCIA DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN HUMANOS EN EL NORESTE DE MÉXICO**”. Subdirección de estudios de posgrado de la Facultad de Medicina de la UANL. Monterrey, N.L. a 10 de junio de 2008.

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS:

1. XXXI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. **SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL OESTE DEL NILO Y REACTIVIDAD CRUZADA CON LOS ANTICUERPOS VS VIRUS DEL DENGUE EN UN GRUPO DE PACIENTES DEL NORESTE DE MÉXICO**. Realizada en Monterrey, N.L. el 14 de Julio del 2006.
2. V Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. **ESTABLECIMIENTO DE LA PREVALENCIA DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN EL NORESTE DE MÉXICO**. Noviembre 28 al 1 de Diciembre del 2006.
3. **SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO Y REACTIVIDAD CRUZADA CON EL VIRUS DEL DENGUE**. XII Congreso de Investigación en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca Morelos. 7 al 9 de Marzo del 2007.
4. XXXII Congreso de la AMIMC y XII Congreso de la AMEIN. **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO (VON) POR PCR EN TIEMPO REAL UTILIZANDO SONDAS TAQ MAN..** Aguascalientes, Ags. Del 7 al 10 de Marzo del 2007.
5. V Jornadas Científicas del Posgrado en Biomedicina y Biotecnología Molecular. **SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO Y REACTIVIDAD CRUZADA CON EL VIRUS DEL DENGUE**. Llevadas a cabo en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Del 23 al 27 de Abril de 2007. México D.F.

6. 65th Annual Meeting “Two Nations, One Cause: Partners in Health”. Presentación Oral del trabajo titulado: SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL OESTE DEL NILO (VON) Y REACTIVIDAD CRUZADA CON LOS ANTICUERPOS VS EL VIRUS DEL DENGUE (VD) EN UN GRUPO DE PACIENTES DEL NORESTE DE MÉXICO. South Padre Island, Texas, EUA. May 20th to the 22rd, 2007.
7. Simposium “La tecnología y su aplicación en la Investigación y el estudio de la Medicina. SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL OESTE DEL NILO Y REACTIVIDAD CRUZADA CON LOS ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE EN UN GRUPO DE PACIENTES DEL NORESTE DE MÉXICO. Organizado por la Universidad México Americana del Norte, A.C. Escuela de Medicina. Cd. Reynosa Tamaulipas. Mayo 24 del 2007.
8. XXIV Congreso Nacional de Investigación Biomédica y Horizontes de la Medicina. MONITOREO SEROLÓGICO Y MOLECULAR DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN SUJETOS DEL NORESTE DE MÉXICO. Llevado a cabo del 29 de agosto al 1 de septiembre de 2007. Monterrey N.L. México.
9. XXIV Congreso Nacional de Investigación Biomédica y Horizontes de la Medicina. SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DEL DENGUE Y VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN DONADORES DE SANGRE DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”. Llevado a cabo del 29 de agosto al 1 de septiembre de 2007. Monterrey N.L. México.
10. Encuentro Estatal de Investigación en Salud 2007. ESTUDIO SEROLÓGICO Y MOLECULAR DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN SUJETOS DEL NORTES DE MÉXICO. Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León. 29 y 30 de Noviembre de 2007.
11. Encuentro Estatal de Investigación en Salud 2007. SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL DENGUE Y VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN DONADORES DE SANGRE DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ ELUTETIO GONZÁLEZ”. Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León. 29 y 30 de Noviembre de 2007.
12. Encuentro Estatal de Investigación en Salud 2007. FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN DELTA CCR5 EN PACIENTES CON INFECCIONES POR FALVIVIRUS. Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León. 29 y 30 de Noviembre de 2007.
13. V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y VI Jornadas Científicas del Posgrado en Biotecnología Molecular y Biomedicina. MONITOREO SEROLÓGICO Y MOLECULAR DEL

VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN EL NORESTE DE MEXICO. e Tuxtla Gutiérrez del 10 al 14 de marzo del 2008.

14. VI Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. EVIDENCIA DE INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN HUMANOS EN EL NORESTE DE MÉXICO. Cd. Reynosa, Tamaulipas, México del 21 al 24 de Octubre de 2008.
15. 13 Congreso de Investigación en Salud Pública. INFECCIÓN POR VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN EL NORESTE DE MÉXICO. Cuernavaca, Morelos, Mex. Del 3 al 6 de marzo de 2009.

RESÚMENES PUBLICADOS EN REVISTAS NACIONALES

1. Garza Rodríguez ML, Ramos Jiménez J, Fernández SI, Martínez L CA, Díaz T MA, Tavitas AMI, Reyes MA y Rivas Estilla AM., participación en la exposición de trabajo libre con el tema: **ESTABLECIMIENTO DE LA PREVALENCIA DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN EL NORESTE DE MÉXICO**, IV Congreso Internacional y XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica en Morelia, Michoacán del 4 al 7 de Abril del 2006.
2. Garza Rodríguez M. L. *, Ramos Jiménez J., Fernández Salas I., Martínez Longoria C. A., Díaz Torres M. A., Tavitas Aguilar M. I., Reyes López M. A., Rivas Estilla A. M. **SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL Y REACTIVIDAD CRUZADA CON LOS ANTICUERPOS VS VIRUS DEL DENGUE EN UN GRUPO DE PACIENTES DEL NORESTE DE MEXICO**. XXXI Congreso de la AMIMC y XI Congreso de la AMEIN. Monterrey N.L. Del 12 al 15 de Julio del 2006. Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Vol. 27 suplemento 2006
3. Garza Rodríguez M. L. *, Martínez Chavarría A., Ramos Jiménez J., Fernández Salas I., Martínez Longoria C. A., Díaz Torres M. A., Tavitas Aguilar M. I., Reyes López M. A., Rivas Estilla A. M. **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO (VON) POR PCR EN TIEMPO REAL UTILIZANDO SONDAS TAQ MAN**. XXXII Congreso de la AMIMC y XII Congreso de la AMEIN. Aguascalientes, Ags. Del 7 al 10 de Marzo del 2007. Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Vol. 27 suplemento 2007.

Anexo 11

Artículo publicado en revista internacional indexado

Este anexo incluye la carta de aceptación de artículo y el artículo completo

On **Fri, 3/13/09**, sthiggs@utmb.edu <sthiggs@utmb.edu> wrote:

From: sthiggs@utmb.edu <sthiggs@utmb.edu>
Subject: Vector-Borne and Zoonotic Diseases - Decision on Manuscript ID VBZ-2008-0203.R2
To: amrivas1@yahoo.ca
Received: Friday, March 13, 2009, 11:15 AM

13-Mar-2009

Dear Dr. Rivas-Estilla:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Serologic surveillance for West Nile virus and other flaviviruses in febrile patients, encephalitic patients and asymptomatic blood donors in northern Mexico" in its current form for publication in Vector-Borne and Zoonotic Diseases. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

The Copyright Agreement form attached to this email should be sent to the publisher as soon as possible. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright. Please fax the Copyright Agreement form to 914-740-2101.

Authors who would like their papers to be made free online immediately after publication can sign up for Liebert Open Option for a one-time fee. If the paper has NIH funding, it will also be uploaded onto PubMedCentral on behalf of the author. Please contact Karen Ballen at kballen@liebertpub.com or at (914) 740-2194 for more information.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Vector-Borne and Zoonotic Diseases, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Stephen Higgs
Editor-in-Chief, Vector-Borne and Zoonotic Diseases

Reviewer(s)' Comments to Author:

Serologic Surveillance for West Nile Virus and Other Flaviviruses in Febrile Patients, Encephalitic Patients, and Asymptomatic Blood Donors in Northern Mexico

María de Lourdes Garza Rodríguez,^{1,2} Diana R. Rodríguez Rodríguez,¹ Bradley J. Blitvich,³ Miguel Á. Reyes López,² Ildelfonso Fernández Salas,⁴ Javier Ramos Jiménez,⁵ José A. Farfán Ale,⁶ Rogelio Cazares Tamez,⁷ César Martínez Longoria,⁵ Maria I. Tavitás Aguilar,⁸ and Ana Maria Rivas-Estilla¹

Abstract

A clinical and serological investigation was performed to determine the presence of West Nile virus (WNV) among febrile and encephalitic patients in northern Mexico. In addition, asymptomatic blood donors were serologically assayed for WNV to determine the seroprevalence of WNV in general population. The study cohort consisted of 1432 individuals (588 febrile patients, 44 encephalitic patients, and 800 asymptomatic blood donors). All subjects were negative for WNV IgM. Sixty subjects were reactive for dengue virus (DENV) IgM (16 blood donors and 44 febrile patients). A subset ($n = 425$) of individuals was also screened by ELISA for flavivirus IgG. The prevalence of flavivirus IgG in febrile patients, encephalitic patients, and blood donors ranged from 40% to 59%. A subset ($n = 147$) of sera reactive for flavivirus IgG was further tested by plaque reduction neutralization test. Six individuals with no history of travel during the preceding 12 months were seropositive for WNV. Another 65 individuals were seropositive for DENV1 and 24 were seropositive for DENV2. The high prevalence of dengue antibodies in northern Mexico appears to limit the incidence of WNV infection in this region.

Article Summary Line: Antibodies to WNV, DENV-1, and DENV-2 were identified in humans in northern Mexico.

Key Words: Blood donor—Dengue virus—Flavivirus—Human—Mexico—Surveillance—West Nile virus.

Introduction

WEST NILE VIRUS (WNV) (family Flaviviridae, genus *Flavivirus*) was first isolated in 1937 from the blood of a febrile woman in the West Nile district of Uganda (Smithburn 1940). The virus was first reported in the Western Hemisphere in 1999 during an outbreak of human, equine, and avian

encephalitis in New York City (Lanciotti et al. 1999, Nash et al. 2001). Since then, WNV has dispersed across the Western Hemisphere and is now found throughout the United States, Canada, Mexico, and the Caribbean, and parts of Central and South America (Komar et al. 2006, Blitvich 2008, Kramer et al. 2008). In the United States, WNV has been responsible for more than 27,000 cases of human illness with over 1000

¹Laboratory of Molecular Infectology, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

²Conservation Medicine, Centro de Biotecnología Genómica and Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México.

³Department of Veterinary Microbiology and Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa.

⁴Department of Entomology, Faculty of Biological Sciences, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

⁵Infectious Diseases Service, Departments of Pediatrics and Internal Medicine, Hospital Universitario "Dr. Jose E. Gonzalez," Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

⁶Centro de Investigaciones Regionales, "Dr. Hideyo Noguchi" Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

⁷Department of Clinical Pathology, Blood Transfusion Center, Hospital Universitario "Dr. Jose E. Gonzalez," Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

⁸Diagnostic Reference Laboratory from Federal Secretariat of Health, Guadalupe, Nuevo León, México.

deaths. In contrast, the introduction of WNV into Mexico has been relatively benign despite data from equine and avian infection surveillance providing evidence of widespread WNV circulation in Mexico since 2003 (Blitvich et al. 2003, Estrada-Franco et al. 2003, Fernandez-Salas et al. 2003, Loroño-Pino et al. 2003). The Mexican Secretary of Public Health has reported seven human cases of WNV in Mexico (Komar et al. 2006, Blitvich 2008). The cases occurred in the States of Chihuahua ($n = 4$), Sonora ($n = 1$), and Nuevo Leon ($n = 1$) in 2003, and Sonora ($n = 1$) in 2004. These states are in northern Mexico, and all border the United States. In addition, WNV RNA has been detected in the Mexican blood supply (Sanchez-Guerrero et al. 2006). The viremic donor was identified as an asymptomatic 41-year-old man from Chihuahua State and was also positive for WNV IgM, but not IgG, suggesting that he had a recently acquired WNV infection.

The reasons for the low incidence of WNV illness in Mexico as compared to the United States are not known. One explanation is that preexisting immunity to another flavivirus is providing partial protection to humans and other vertebrates from subsequent WNV infection. Indeed, laboratory studies have shown that prior immunization of hamsters with heterologous flaviviruses (Japanese encephalitis, St. Louis encephalitis virus [SLEV] and Yellow fever viruses) reduces the severity of subsequent WNV infection (Tesh et al. 2002). The four serotypes of dengue virus (DENV1–DENV4) and SLEV are endemic in many regions of Mexico and therefore could be reducing the incidence and/or severity of WNV infections in humans in Mexico (Gubler 2002, 2006, Hayes and Gubler 2006, Blitvich 2008, Kramer et al. 2008). Other explanations include under-reporting, the emergence of attenuated WNV variants, and geographic differences in the species composition, relative abundance, and susceptibility of vertebrates or vectors.

The majority of WNV infections are subclinical with no apparent symptoms, but during recent outbreaks in the United States, approximately 20% of infections have resulted in a mild flu-like illness known as West Nile fever (WNF), and 1 in 150 infections has resulted in severe neuroinvasive disease (WNND) (Mostashari et al. 2001, Gubler 2002, Hayes and Gubler 2006). WNF is characterized by a variety of nonspecific symptoms (fever, headache, myalgia, nausea, fatigue, weakness, vomiting, and diarrhea) that cannot be distinguished from other infectious illnesses on clinical examination. The illness typically lasts for 2–5 days, but in more severe cases, fatigue can persist for over a month. WNND is characterized by encephalitis, meningitis, and/or poliomyelitis-like flaccid paralysis. The fatality rate in patients with WNND is approximately 10%, and long-term neurological sequelae occurs in >50% of patients (Hayes et al. 2005, Hayes and Gubler 2006, Sejvar and Marfin 2006).

The laboratory test most commonly used for WNV diagnosis is the IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA) (Martin et al. 2000, 2002). This assay provides a rapid and sensitive method to detect WNV IgM, which is usually detected in patients at clinical presentation but can persist for more than a year (Roehrig et al. 2003). Another technique routinely used for WNV diagnosis is the indirect IgG ELISA, which is often performed in tandem with the MAC-ELISA (Tardei et al. 2000). This technique exhibits a high degree of sensitivity when used to screen sera for the presence of WNV IgG. However, because of the cross-reactivity of anti-flaviviral IgG, the assay is not WNV specific.

For this reason, samples positive by flavivirus IgG ELISA are often further tested by plaque reduction neutralization test (PRNT), the most accurate serologic test available for flavivirus diagnosis (Beaty 1995). PRNTs performed using WNV and other flaviviruses endemic in the same area provide the most accurate serologic approach to identify WNV infections and distinguish serologic cross-reactions among flaviviruses.

In this study, we performed a clinical and serological investigation to obtain information that could help to explain the low incidence of WNV illness in northern Mexico. Patients who presented clinical signs consistent with WNF or WNND were recruited for the study and serologically assayed for WNV and other flaviviruses by MAC-ELISA, IgG ELISA, and/or PRNT. In addition, the seroprevalence of WNV in the general population of northern Mexico was estimated using asymptomatic blood donors as a convenience population.

Materials and Methods

Study population

Our study cohort consisted of three groups of individuals: (i) patients with suspected WNF, (ii) patients with suspected WNND, and (iii) asymptomatic blood donors. Our criteria for suspected WNF and WNND were consistent with the U.S. national case definition established by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (CDC 2009). The clinical criterion for WNF was the presence of documented fever, as measured by the patient or clinician, in the absence of WNND. The clinical criterion for WNND was the presence of fever in addition to at least one of the following (as measured by the clinician): (i) an acutely altered mental status such as disorientation, stupor, and coma, (ii) other acute signs of central or peripheral neurologic dysfunction such as paralysis, sensory deficits, abnormal reflexes, generalized convulsions, and abnormal movements, or (iii) illness clinically compatible with meningitis (e.g., headache or stiff neck).

Patients and asymptomatic blood donors were recruited between October 2005 and September 2007 from the following Health Centers localized in Monterrey, Mexico: the Dr. Jose E. Gonzalez University Hospital School of Medicine (Universidad Autonoma de Nuevo Leon, UANL), a Diagnostic Reference Laboratory from Federal Secretariat of Health, and a third-level Hospital Number 33 from government Social Insurance. Written consent to participate in the study was obtained from each subject. For patients <18 years of age, written consent was obtained from parents or legal guardians. A serum sample was collected from each individual who agreed to participate. Demographic information and other pertinent information (symptoms, travel history, and vaccination status) were obtained for each study participant by self-questionnaire. Individuals who had been immunized against yellow fever virus were not included in this study because they had preexisting flavivirus antibody that could potentially cause serologic cross-reactivity in the diagnostic assays. All data were handled confidentially and anonymously. All research protocols were approved by the institutional review boards at the UANL and Iowa State University (ISU).

Demographic characteristics

A total of 1432 individuals were recruited for the study (Table 1). Of these, 588 were patients with unspecified fever,

◀ AU2
◀ T1

AU1 ▶

FLAVIVIRUS ANTIBODIES WERE IDENTIFIED IN HUMANS IN MEXICO

3

TABLE 1. DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDY COHORT

Demographic characteristics	Study group			Total
	Febrile patients	Encephalitic patients	Blood donors	
No. participants	588	44	800	1432
No. males	182	27	658	867
No. females	406	17	142	565
Male:female ratio	1:2.2	1:0.6	1:0.2	1:0.7
Age range (years)	1–73	1–79	18–60	1–79
Mean age	28	33	32	31
State of residence:				
(1) Nuevo Leon	588	43	767	1398
(2) Coahuila	0	0	8	8
(3) Tamaulipas	0	1	25	26

44 were patients with encephalitic manifestations, and 800 were asymptomatic blood donors. There were 867 (61%) males and 565 (39%) females. All study participants were from northern Mexico. The majority lived in Nuevo Leon State; the remainder lived in Coahuila State and Tamaulipas State. The ages of the study participants ranged from 1 to 79 years. The mean age was 31 years.

WNV MAC-ELISA

All sera were assayed for WNV IgM using the WNV IgM Capture-ELISA from Focus Technologies (Cypress, CA) in the Biosafety Level 2 facilities at the UANL following the manufacturer's instructions. Test samples and positive and negative controls were diluted 1:100 and then added to microwells coated with anti-human IgM antibodies. After 1 h incubation, wells were washed and WNV antigen was added. After 2 h incubation, plates were washed again and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse antinflavivirus conjugate was added. Plates were incubated for 30 min and then washed, and a substrate consisting of tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide was added to each well. After 10 min, stop solution was added and the absorbance was determined spectrophotometrically at 450 nm. Index values for test sera and controls were obtained by dividing the absorbance of the test or control well by the absorbance of the calibrator (cutoff control). Index values of <0.9 were considered negative, values from 0.9 to 1.1 were considered equivocal, and values of >1.1 were considered positive for IgM.

DENV MAC-ELISA

All sera were assayed for DENV IgM using the Dengue IgM Capture ELISA from PanBio Diagnostics (Brisbane, Australia). Test samples and positive and negative controls were diluted 1:100 and added to the 96-well plates precoated with capture antibody (anti-human IgM). After incubation, wells were washed, and an antigen-MAb complex containing a mixture of DENV 1–4 antigens together with an HRP-labeled MAb specific to the DENV antigens was added. After second 1 h incubation and wash step, TMB substrate was added; after 10 min, stop solution was added and the absorbance was determined spectrophotometrically at 450 nm. Index values of <0.9 were considered negative, values from 0.9

to 1.1 were considered equivocal, and values of >1.1 were considered positive for IgM.

Flavivirus indirect IgG ELISA

A subset of sera were assayed for flavivirus IgG using the WNV IgG ELISA from Focus Technologies and DENV IgG Indirect ELISA from PanBio Diagnostics. Test samples and positive and negative controls were diluted 1:100 and added to the wells of 96-well plates precoated with DENV and WNV antigen (Malan et al. 2004). After 1 h incubation, wells were washed and HRP-conjugated sheep anti-human IgG was added. After a 30 min incubation and wash step, TMB substrate was added; after 10 min, stop solution was added and the absorbance of each well is determined spectrophotometrically at 450 nm. Our results were reported as index values relative to the Cut-off calibrator. Index values for test sera and controls were obtained by dividing the absorbance (OD) of the test or control well by the mean of absorbance values of the Cut-off Calibrator. Index values of <1.3 were considered negative, values from 1.3 to 1.5 were considered equivocal, and values of >1.5 were considered positive for IgG (Hogrefe et al. 2004, Tilley et al. 2005).

PRNT

A subset of sera were demonstrated to contain antibodies to flaviviruses by MAC-ELISA, and/or IgG ELISA were subsequently tested by PRNT in the Biosafety Level 3 facilities at ISU according to standard methods (Beaty 1995). PRNTs were done using WNV (strain NY99-35261-11), SLEV (strain TBH-28), DENV-1 (strain Hawaii), DENV-2 (strain NGC), DENV-3 (strain H-87), and DENV-4 (strain 241). SLEV and the four serotypes of DENV were included because they occur in Mexico, and are known to react with antibodies to WNV (Calisher et al. 1989, Burke et al. 2001). Viruses were obtained from the World Health Organization Center for Arbovirus Reference and Research maintained at the CDC, Division of Vector-Borne Infectious Diseases (Fort Collins, CO). The PRNTs were performed using African green monkey kidney (Vero) cells, with the exception of DENV-1 PRNTs, which were performed using Rhesus monkey kidney (LLC MK) cells. Sera were tested in the presence of 8% labile serum factor (Chappell et al. 1971). Sera were initially tested at a dilution of 1:20. Those that reduced the number of plaques by >70% (PRNT₇₀) were titrated. Titers were expressed as the reciprocal of serum dilutions yielding >90% reduction in the number of plaques (PRNT₉₀). For etiologic diagnosis, the PRNT₉₀ antibody titer to the respective virus was required to be at least fourfold greater than that to the other flaviviruses tested.

WNV case definition

In this study, a patient was considered to have an acute clinical WNV infection if all of the following criteria were met: (i) the patient had symptoms consistent with WNF or WNND, (ii) the patient was positive for the presence for WNV IgM by MAC-ELISA, and (iii) the patient's PRNT₉₀ antibody titer to WNV was at least fourfold greater than that to the other flaviviruses tested. An asymptomatic blood donor was considered to have a recent subclinical WNV infection if the donor was positive for the presence of WNV IgM by MAC-ELISA and their PRNT₉₀ antibody titer to WNV was at least fourfold greater than that to the other flaviviruses tested.

Results

Screening for WNV and DENV IgM

All study participants were screened by MAC-ELISA for the presence of WNV and DENV IgM. Individuals from all three study groups were negative for WNV IgM. Sixteen blood donors and 44 febrile patients were reactive for DENV IgM, which suggests that they had recent DENV infections. None of the encephalitic patients were reactive for DENV IgM.

Screening for flavivirus IgG

A subset ($n = 425$) of participants were screened for antibodies to flaviviruses using the group-reactive WNV and/or DENV IgG ELISA. Of these, 51 were tested by WNV IgG ELISA only, 93 tested by DENV IgG ELISA only, and 281 were tested by both assays. Overall, 248 febrile patients, 42 encephalitic patients, and 135 blood donors were tested. Of these, flavivirus IgG was detected in 142 (57%) febrile patients, 17 (40%) encephalitic patients, and 80 (59%) blood donors (Table 2).

Screening for neutralizing antibodies to flaviviruses

A subset ($n = 147$) of sera that had antibodies to flaviviruses by MAC-ELISA and/or IgG ELISA were further analyzed by PRNT using WNV, SLEV, and all four serotypes of DENV. Six individuals were seropositive for WNV (Table 3). Of these, two were asymptomatic blood donors and four were febrile patients. However, the febrile patients did not meet the case definition for WNV because they were negative for WNV IgM. These data suggest that the patients had a prior WNV infection, but this virus was not responsible for the clinical signs observed at the time of presentation. Similarly, the two asymptomatic blood donors seropositive for WNV were negative for WNV IgM, suggesting that they did not have recently acquired WNV infections. All six individuals seropositive for WNV lived in Nuevo Leon State, and none had traveled outside the state during the preceding 12 months. These data indicate that the six individuals had locally acquired WNV infections. The two blood donors seropositive for WNV were male; one was 19 years of age, and the other

was 43 years. Of the four febrile patients seropositive for WNV, three were male and one was female. Their ages ranged from 26 to 45 years. Representative serologic data from 14 flavivirus-positive study participants are shown in Table 4.

Sixty-four individuals were seropositive for DENV-1 and another 23 were seropositive for DENV-2 (Table 3). Of the individuals seropositive for DENV-1, 44 were febrile patients, 9 were encephalitic patients, and 11 were asymptomatic blood donors. Of the individuals seropositive for DENV-2, 20 were febrile patients, 1 was an encephalitic patient, and 2 were asymptomatic blood donors. Twenty-four individuals were seropositive for an undetermined DENV serotype (Tables 3 and 4). An individual was considered to be seropositive for an undetermined DENV serotype when the PRNT₉₀ antibody titer to one DENV serotype was at least fourfold greater than that to WNV and SLEV, but not all of the other DENV serotypes. Twenty-two individuals were considered to have a secondary flavivirus infection as indicated by the high PRNT₉₀ antibody titers to all viruses tested. Eight individuals had no neutralizing antibodies to flaviviruses. No study participants were seropositive for DENV-3, DENV-4, or SLEV.

Discussion

We performed a clinical and serological investigation to determine the incidence of WNV illness in febrile and encephalitic patients in northern Mexico. Our main rationale for undertaking this investigation was to obtain information that could explain why a major outbreak of WNV illness has not been observed in this region. Of the 632 patients who presented with suspected WNF or WNND, all were negative for WNV IgM; thus, none of the patients recruited for this study met the CDC case definition for WNV. Based on these

T2 ▶

T3 ▶

◀ T4

TABLE 2. PREVALENCE OF WEST NILE VIRUS IGM, DENGUE VIRUS IGM, AND FLAVIVIRUS IGG IN EACH STUDY GROUP

Serologic test	Study group		
	Blood donors	Febrile patients	Encephalitic patients
WNV MAC-ELISA	0/800 (0%)	0/588 (0%)	0/44 (0%)
DENV MAC-ELISA	16/800 (2.0%)	44/588 (7.5%)	0/44 (0%)
Flavivirus IgG ELISA	80/135 (59.3%)	142/248 (57.3%)	17/42 (40.5%)

Data are presented as the number of individuals tested/number of individuals positive.

WNV MAC-ELISA, West Nile virus IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay; DENV MAC-ELISA, dengue virus IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay.

TABLE 3. SEROLOGIC SUMMARY OF THE SUBSET OF FEBRILE PATIENTS, ENCEPHALITIC PATIENTS, AND ASYMPTOMATIC BLOOD DONORS TESTED BY PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST

PRNT diagnosis	Study group			Total
	Febrile patients	Encephalitic patients	Blood donors	
WNV	4	— ^a	2	6 (4%) ^b
SLEV	—	—	—	—
DENV-1	44	9	11	64 (43.5%)
DENV-2	20	1	2	23 (15.6%)
DENV-3	—	—	—	—
DENV-4	—	—	—	—
DENV (undetermined serotype)	16	3	5	24 (16.3%)
Secondary flavivirus infection	22	—	—	22 (14.9%)
Negative	6	1	1	8 (5.4%)
Total	112	14	21	147 (100%)

^a0.

^bAll individuals seropositive for WNV by PRNT were negative for WNV IgM, suggesting that these infections were not recent.

PRNT, plaque reduction neutralization test; SLEV, St. Louis encephalitis virus.

FLAVIVIRUS ANTIBODIES WERE IDENTIFIED IN HUMANS IN MEXICO

5

TABLE 4. SEROLOGIC SUMMARY OF A SUBSET OF INDIVIDUALS WITH ANTIBODIES TO FLAVIVIRUSES

Sample ID	Participant type	PRNT ₉₀ titer						PRNT diagnosis
		WNV	SLEV	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	
B004	Blood donor	20	— ^a	160	40	20	40	DENV-1
B029	Blood donor	320	20	20	—	—	20	WNV
B038	Blood donor	—	—	40	—	—	20	DENV (undetermined serotype)
F100	Febrile patient	640	320	20,480	10,240	2560	10,240	Secondary flavivirus infection
F011	Febrile patient	10,240	640	10,240	10,240	1280	20,480	Secondary flavivirus infection
B034	Blood donor	—	20	320	80	40	80	DENV-1
F160	Febrile patient	20	—	40	320	20	20	DENV-2
F193	Febrile patient	—	—	160	80	—	40	DENV (undetermined serotype)
F047	Febrile patient	20	—	40	160	40	40	DENV-2
F043	Febrile patient	640	20	20	40	—	20	WNV
N 040	Encephalitis	5120	80	10,240	20,480	20,480	20,480	Secondary flavivirus infection
N012	Encephalitis	20	—	160	40	40	40	DENV-1
N017	Encephalitis	20	—	160	320	160	160	DENV (undetermined serotype)
N016	Encephalitis	20	—	80	320	80	80	DENV-2

^aLess than 20.

findings, we speculate that under-reporting is not the major reason for the low number of WNV cases in northern Mexico.

Flavivirus IgG was detected in the majority of study participants. Of the subset of febrile and encephalitic patients screened by IgG ELISA, 57% and 40%, respectively, were positive for flavivirus IgG. The majority (59%) of asymptomatic blood donors screened for flavivirus IgG were also positive. Taken together, these data suggest that the majority of individuals in northern Mexico have had previous exposure to one or more flaviviruses. The PRNT analysis demonstrated that DENV was responsible for most flavivirus infections. Thus, we propose that the main reason for the absence of an observed outbreak of WNV illness in humans in northern Mexico is that a large proportion of the population has been infected with DENV and is therefore resistant or less susceptible to severe WNV disease. In this regard, laboratory studies have shown that prior immunization of rodents, monkeys, and pigs with heterologous flaviviruses reduces the severity of subsequent WNV infection (Price et al. 1971, Goverdhan et al. 1992, Ilkal et al. 1994, Tesh et al. 2002). The low incidence of WNV illness elsewhere in Mexico, and in Central and South America, could also be attributed to prior exposure to DENV. Indeed, more than 850,000 cases of dengue fever occurred throughout in Latin America in 2007, including 25,000 cases of dengue hemorrhagic fever (Kyle and Harris 2008). However, preexisting immunity to DENV does not account for the apparent lack of WNV-associated equine and avian death in northern Mexico and elsewhere in Latin America because DENV does not usually replicate in non-primate vertebrates (Thomas et al. 2003). Thus, it is likely that other factors are contributing to the sparse reports of WNV illness in humans and other vertebrates in Latin America.

Of the subset of individuals tested by PRNT, 41% were seropositive for DENV1 and 15% were seropositive for DENV2. These two DENV serotypes were also shown to be responsible for human infections in a household serosurvey conducted in 2004 in the contiguous border cities of Matamoros, Tamaulipas (Mexico), and Brownsville, Texas (Brunkard et al. 2007). Recent DENV infection was identified in 7.3% of Matamoros residents and 2.0% of Brownsville resi-

dents. Prior DENV infection was identified in 78% of Matamoros residents and 40% of Brownsville residents. Of the subset ($n=3$) of individuals further tested by PRNT, two residents from Matamoros were seropositive for DENV-1, and one resident from Brownsville was seropositive for DENV-2. The following year, an outbreak of DENV occurred in the cities of Matamoros and Brownsville (Ramos et al. 2008). Twenty-eight viral isolates were obtained: 27 were DENV-2 and 1 was DENV-1. We also demonstrated that 24% of the individuals tested by PRNT had been infected with an undetermined DENV serotype. For these individuals, the PRNT titer was always highest when DENV-1 or DENV-2 was used for the PRNT analysis. Twenty-two percent of individuals tested by PRNT had secondary flavivirus infections consistent with our findings that multiple flaviviruses (DENV1, DENV2, and WNV) are circulating in northern Mexico. Eight hundred asymptomatic blood donors were serologically assayed for WNV and two (0.25%) were positive. These data indicate that the incidence of WNV infection in the general population in northern Mexico is low. In comparison, 46 (3.1%) of 1505 individuals sampled in 2002 in a household-based seroprevalence survey in Ontario, Canada, were seropositive for WNV (Loeb et al. 2005). In another study, 122 (14.0%) of 869 individuals sampled at a health-fair in Wyoming in 2003 had antibodies to WNV (Murphy et al. 2005). However, it is important to note that different methods were used to recruit study participants in these studies, and that there are limitations associated with using blood donors as a convenience population, most notably selection bias. Indeed, blood donors are potentially more healthy and active than other individuals and therefore could be more likely to participate in outdoor activities that result in increased contact with mosquitoes. Alternatively, because blood donors are potentially more health conscious than other individuals, they could be more inclined to use protective measures to avoid mosquito contact. Household-based serosurveys provide a more accurate means to sample individuals that more closely represent the general population. However, this approach is not always feasible because considerable time, effort, and resources are needed to recruit the study population.

In conclusion, we detected a high seroprevalence of DENV in our study cohort, but did not identify any individuals that met the CDC case definition of WNV. We speculate that preexisting immunity to DENV is the principal reason as to why a major outbreak of WNV illness has not been observed in humans in northern Mexico. Because DENV is endemic in many other regions of Latin America, this phenomenon could be a critical determinant in determining the ultimate geographic distribution and public health importance of WNV in the Americas.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Karina Trujillo Murillo for technical support and Félix Rositas Noriega, M.D., Marco Díaz Torres, M.D., Hector J. Villarreal, M.D., and Teresa de San Juan Chapa, M.D. (Hospital 33), for clinical support. They also thank the staff at the Central Blood Bank of the University Hospital "Dr. Jose E. Gonzalez" at the Universidad Autónoma de Nuevo León for their support and technical advice.

This work was supported in part by the following grants: FOMIX NL-2003-CO4-12553 (to Ph.D. Ana M Rivas-Estilla). Grants 20060351 and 20070405 from the Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) Instituto Politécnico Nacional, grant 48497 from CONACYT to Dr. Miguel Á Reyes López and grant SEP-2004-C01-47355 to Dr. Ildefonso Fernandez-Salas. PRNTs were performed using funds provided by The National Institutes of Health (Grant 5R21AI067281).

Disclosure Statement

No Competing financial interests exist.

References

- AU3 ► Beaty, B, Calisher, CH, Shope, RE. Arboviruses. In: L. E ed. *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases*. APHA, 1995:189–212.
- Blitvich, BJ. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim Health Res Rev* 2008; 9:71–86.
- Blitvich, BJ, Fernandez-Salas, I, Contreras-Cordero, JF, Marlenee, NL, et al. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:853–856.
- Brunkard, JM, Robles Lopez, JL, Ramirez, J, Cifuentes, E, et al. Dengue fever seroprevalence and risk factors, Texas-Mexico border, 2004. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1477–1483.
- Burke, D, Monath, T. Flaviviruses. In: Knipe, D, Howley, P, eds. *Fields Virology*, fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001:1043–1126.
- Calisher, CH, Karabatsos, N, Dalrymple, JM, Shope, RE, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 1989; 70 (Pt 1):37–43.
- CDC 2009. The U.S. National Case Definition for West Nile virus. http://www.cdc.gov/epo/dphsi/casedef/arboviral_current.htm. Accessed on January 24, 2009.
- Chappell, WA, Sasso, DR, Toole, RF, Monath, TP. Labile serum factor and its effect on arbovirus neutralization. *Appl Microbiol* 1971; 21:79–83.
- Estrada-Franco, JG, Navarro-Lopez, R, Beasley, DW, Coffey, L, et al. West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:1604–1607.
- Fernandez-Salas, I, Contreras-Cordero, JF, Blitvich, BJ, Gonzalez-Rojas, JI, et al. Serologic evidence of West Nile Virus infection in birds, Tamaulipas State, Mexico. *Vector Borne Zoonot Dis* 2003; 3:209–213.
- Goverdhan, MK, Kulkarni, AB, Gupta, AK, Tupe, CD, et al. Two-way cross-protection between West Nile and Japanese encephalitis viruses in bonnet macaques. *Acta Virol* 1992; 36:277–283.
- Gubler, DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 2002; 10:100–103.
- Gubler, DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp* 2006; 277:3–16; discussion 16–22, 71–13, 251–253.
- Hayes, EB, Gubler, DJ. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annu Rev Med* 2006; 57:181–194.
- Hayes, EB, Sejvar, JJ, Zaki, SR, Lanciotti, RS, et al. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1174–1179.
- Hogrefe, WR, Moore, R, Lape-Nixon, M, Wagner, M, et al. Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus- and other flavivirus-specific antibodies. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4641–4648.
- Ilkal, MA, Prasanna, Y, Jacob, PG, Geevarghese, G, et al. Experimental studies on the susceptibility of domestic pigs to West Nile virus followed by Japanese encephalitis virus infection and vice versa. *Acta Virol* 1994; 38:157–161.
- Komar, N, Clark, GG. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica* 2006; 19:112–117.
- Kramer, LD, Styer, LM, Ebel, GD. A global perspective on the epidemiology of West Nile Virus. *Annu Rev Entomol* 2008; 53:61–81.
- Kyle, JL, Harris, E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol* 2008; 62:71–92.
- Lanciotti, RS, Roehrig, JT, Deubel, V, Smith, J, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 1999; 286:2333–2337.
- Loeb, M, Elliott, SJ, Gibson, B, Fearon, M, et al. Protective behavior and West Nile virus risk. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1433–1436.
- Lorono-Pino, MA, Blitvich, BJ, Farfan-Ale, JA, Puerto, FI, et al. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:857–859.
- Malan, AK, Martins, TB, Hill, HR, Litwin, CM. Evaluations of commercial West Nile virus immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme immunoassays show the value of continuous validation. *J Clin Microbiol* 2004; 42:727–733.
- Martin, DA, Muth, DA, Brown, T, Johnson, AJ, et al. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1823–1826.
- Martin, DA, Biggerstaff, BJ, Allen, B, Johnson, AJ, et al. Use of immunoglobulin m cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:544–549.
- Mostashari, F, Bunning, ML, Kitsutani, PT, Singer, DA, et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet* 2001; 358:261–264.
- Murphy, TD, Grandpre, J, Novick, SL, Seys, SA, et al. West Nile virus infection among health-fair participants, Wyoming 2003:

FLAVIVIRUS ANTIBODIES WERE IDENTIFIED IN HUMANS IN MEXICO

7

- assessment of symptoms and risk factors. *Vector Borne Zoonot Dis* 2005; 5:246–251.
- Nash, D, Mostashari, F, Fine, A, Miller, J, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* 2001; 344:1807–1814.
- Price, WH, Thind, IS. Protection against West Nile virus induced by a previous injection with dengue virus. *Am J Epidemiol* 1971; 94:596–607.
- Ramos, MM, Mohammed, H, Zielinski-Gutierrez, E, Hayden, MH, et al. Epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever at the Texas-Mexico border: results of a household-based seroepidemiologic survey, December 2005. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78:364–369.
- Roehrig, JT, Nash, D, Maldin, B, Labowitz, A, et al. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin m antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:376–379.
- Sanchez-Guerrero, SA, Romero-Estrella, S, Rodriguez-Ruiz, A, Infante-Ramirez, L, et al. Detection of West Nile virus in the Mexican blood supply. *Transfusion* 2006; 46:111–117.
- Sejvar, JJ, Marfin, AA. Manifestations of West Nile neuroinvasive disease. *Rev Med Virol* 2006; 16:209–224.
- Smithburn, KC, Hughes, TP, Burke, AW, Paul, JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 1940; 20:471–492.
- Tardei, G, Ruta, S, Chitu, V, Rossi, C, et al. Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile virus infection. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2232–2239.
- Tesh, RB, Travassos da Rosa, AP, Guzman, H, Araujo, TP, et al. Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:245–251.
- Thomas, SJ, Strickman, D, Vaughn, DW. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv Virus Res* 2003; 61:235–289.
- Tilley, PA, Walle, R, Chow, A, Jayaraman, GC, et al. Clinical utility of commercial enzyme immunoassays during the inaugural season of West Nile virus activity, Alberta, Canada. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4691–4695.

Address reprint requests to:

Ana Maria Rivas-Estilla

Department of Biochemistry and Molecular Medicine

Faculty of Medicine

Universidad Autónoma de Nuevo León

Av. Francisco I. Madero y Eduardo Aguirre Pequeño s/n

Col. Mitras Centro CP 64460

Monterrey

Nuevo León

México

E-mail: amrivas1@yahoo.ca

AUTHOR QUERY FOR VBZ-2008-0203-GARZA RODRIGUEZ 1P

AU1: "St. Louis encephalitis" has been changed to "St. Louis encephalitis virus." Please check.

AU2: Demographic characteristics section does not belong to Results section; hence, it has been moved to Materials and Methods section. Please confirm.

AU3: In Ref. "Beaty . . . 1995," please check the editor name "L. E" and please mention publisher's location.