



Revista MVZ Córdoba
ISSN: 0122-0268
ISSN: 1909-0544
revistamvz@gmail.com
Universidad de Córdoba
Colombia

Virus del Nilo Occidental en Ecuador

Coello-Peralta, Roberto; González-González, Manuel; Martínez-Cepeda, Galo
Virus del Nilo Occidental en Ecuador

Revista MVZ Córdoba, vol. 24, núm. 1, 2019
Universidad de Córdoba, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69357845019>
DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1603>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

Virus del Nilo Occidental en Ecuador

West Nile virus in Ecuador

Roberto Coello-Peralta

University of Guayaquil, Ecuador

rdcoello1218@hotmail.com

DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1603>

Redalyc: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69357845019>

Manuel González-González

University of Guayaquil, Ecuador

dr.gonzalezmanuel@gmail.com

Galo Martínez-Cepeda

University of Babahoyo, Ecuador

galomartinez88@gmail.com

Recepción: 01 Marzo 2017

Aprobación: 01 Octubre 2018

Publicación: 01 Marzo 2019

RESUMEN:

El presente es una revisión bibliográfica sobre estudios realizados para determinar la presencia y circulación del Virus del Nilo Occidental (VNO) en diversas especies que interactúan en importantes ecosistemas del Ecuador, como son las Islas Galápagos, en donde, se han realizado estudios de presencia y vigilancia del VNO en aves silvestres y migratorias (2003) (2008 al 2010) y pingüinos (2003 al 2004). También, se ha realizado estudios en aves de diversos lugares de Guayaquil (2011), y en equinos de Jaunecche (2007) pero en ninguno de los lugares se evidenció la presencia del virus. Por otro lado, en el humedal Abras de Mantequilla, Coello y colaboradores realizaron dos estudios en equinos de edades entre 3 meses a 12 años, todos de raza mestiza, sexo machos y hembras, sin antecedentes de vacunación y con presencia de síntomas solo en el primer estudio. El análisis de los sueros en los dos estudios se realizó mediante la técnica de ELISA (determinación de reactividad) y la confirmación a través de Neutralización por Reducción del Número de Placas (NTRP). En el primer estudio se determinó el 8.12% (13/160) de reactividad en 13 equinos y el 22.22% de reactividad en 2 de 9 personas (no se confirmaron); del total de muestras reactivas en equinos, solo se confirmó el 3.12% (5 equinos/160) de la presencia de anticuerpos IgM contra VNO. Respecto al segundo estudio estableció el 12.6% (52/412) de reactividad y el 10.4% (43/412 equinos) se confirmó la evidencia serológica del VNO, con una prevalencia final del 6.76%. Por lo consiguiente, el VNO está presente y circulando en los equinos de la zona costera ecuatoriana, lo cual es un riesgo potencial para la salud pública, sin embargo no hay información actualizada de investigaciones realizadas al respecto.

PALABRAS CLAVE: Equino, flavivirus, mosquitos, serología.

ABSTRACT:

Several studies have been carried out to determine the presence and circulation of West Nile Virus (WNV) in several species that interact in important ecosystems of Ecuador, such as the Galapagos Islands, where presence and surveillance studies of WNV have been carried out in wild and migratory birds (2003) (2008 to 2010), penguins (2003 to 2004). Studies have also been carried out on birds from different locations in Guayaquil (2011), and on Jaunecche horses (2007), but no virus has been demonstrated in any of them. Nevertheless, in the Abras de Mantequilla wetland, two studies were conducted in equines aged between 3 months to 12 years, all of them mixed race, male and female, with no previous vaccination history and with presence of symptoms only in the first study. In the two studies the serum analysis was performed by the ELISA technique (reactivity determination) and Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT). In the first study, 8.12% (13/160) of reactivity was determined in 13 horses and 22.22% of reactivity in 2 of 9 people; and only 3.12% (5/160 horses) of the presence of IgM antibodies against WNV. In relation to the second study, 12.6% (52/412) reactivity and 10.4% (43/412 horses) confirmed the serological evidence of WNV, with a final prevalence of 6.76%. Consequently, the WNV is present and circulating in the equines of the Ecuadorian coastal zone, which is a potential risk to the public health, nevertheless there is no updated information on investigations conducted in this regard.

KEYWORDS: Equine, flavivirus, mosquitoes, serological.

INTRODUCCIÓN

El Virus del Nilo Occidental (VNO) es un virus ARN de la familia Flaviviridae, de sentido positivo monocatenario, cuyos vectores de transmisión son principalmente los mosquitos, el VNO ha sido la principal causa de encefalitis por arbovirus en todo el mundo, el cual forma parte del complejo de encefalitis japonesa (1). El virus fue originalmente aislado de Uganda en 1937; años posteriores causó brotes epidémicos en Asia, Europa y Australia; y en 1999 apareció por primera vez en el continente Americano en la ciudad de New York (EEUU) (2). El genoma del WNV es de 10.8 Kb de longitud, que se traduce y procesa en 10 proteínas: 3 proteínas estructurales (envoltura [E], matriz [M], cápside [C]) y 7 proteínas no estructurales (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (3,4,5). La exocitosis es el mecanismo por el cual las vesículas cargadas de viriones emergen de la célula huésped; dichos viriones son ensamblados en el retículo endoplásmico (6,7,8).

El WNV es considerada una zoonosis de tipo aviar, que circula y es mantenida en la naturaleza, a través de un ciclo enzoótico entre especies aviares y mosquitos. Las especies *Culex pipiens*, *Cx. tarsalis* y *Cx. quinquefasciatus* son los vectores más destacados en la transmisión del virus en América del Norte (9).

La mayoría de las infecciones humanas son asintomáticas, aproximadamente el 20% de las personas infectadas se vuelven sintomáticas y desarrollan enfermedades agudas, que van desde una gripe sistémica a resultados neuroinvasivos (meningitis) (10); en animales la especie afectada son los equinos, los cuales pueden generar una neuropatía fatal en el peor de los casos (11).

Actualmente, se ha comprobado que la circulación del VNO en la naturaleza se da a través de una red de transmisión (varios ciclos) en la que involucra algunos géneros y especies de aves, algunos géneros y especies de mosquitos, algunos mamíferos y garrapatas (12).

Los seres humanos infectados con el VNO pueden presentar una tasa de mortalidad entre el 1 al 30% (12), en contraste, la tasa de mortalidad en los equinos ronda entre el 38-57.1% (13).

Desde el ingreso al continente Americano, se ha reportado actividad viral en equinos y aves en la mayoría de países del continente (14). El primer caso de VNO en ecosistemas sudamericanos se dio en el 2006 en Argentina, donde el virus fue aislado de los cerebros de dos caballos muertos (15), además, se han registrado casos serológicos de equinos, en Trinidad 4% (16), Colombia 9.23% (17), Venezuela 4.3% (18), Argentina 16.2% (19), Brasil 3% (20) y Uruguay 2% (21).

Por otro lado, todos los flavivirus son antigenicamente relacionados, dando frecuentes reacciones cruzadas, en especial en sitios donde dos o más flavivirus son endémicos y enzoóticos, por lo que es meritorio ser confirmados por diferentes métodos de diagnóstico (11). Respecto a estudios serológicos para VNO como prueba de screening se recomienda la prueba serológica de ELISA, pero es necesario la confirmación de las muestras, a través de la prueba de Neutralización por Reducción del Número de Placas (NTRP) debido a las intensas reacciones cruzadas entre flavivirus (22).

En el Ecuador se han realizado investigaciones en distintos lugares para la detección de la presencia y circulación del VNO; además de lugares distintos, se ha buscado en distintas especies aviares tanto domésticas como silvestres, dentro y fuera del Ecuador continental. Dentro de los ecosistemas ecuatorianos a destacar son las Islas Galápagos (23-24), golfo de Guayaquil (25), Jaunecche y el Humedal Abras de Mantequilla en la provincia de los Ríos (26).

Estudios realizados en Ecuador: Sitios de Estudios

Islas Galápagos: Es un Archipiélago ubicado a 972 km de la costa de Ecuador, declarado patrimonio de la humanidad por la UNESCO, está constituida por 13 islas grandes, 6 islas medianas y 215 islotes, y es muy famoso en el mundo por su biodiversidad (25). En agosto del 2003, en las islas Isabela y Fernandina, se realizó una investigación serológica contra VNO en 69 aves endémicas llamadas cormorán no volador (*Phalacrocorax harrisi*) (23); también, entre el 2003 y 2004, en las mismas islas descritas anteriormente, se efectuó un estudio serológico en 195 pingüinos (*Spheniscus mendiculus*) (24), además, durante octubre de

2008, mayo de 2009 y noviembre de 2010 en las islas Santa Cruz y Baltra, y durante febrero de 2010 en la isla San Cristóbal, en 423 aves vivas (domésticas y silvestres) se realizaron estudios serológicos y en 156 aves muertas se realizaron estudios de identificación viral (RT-PCR)(25).

Guayaquil: Es una ciudad eminentemente tropical, de gran importancia turística que se encuentra ubicada en el golfo de Guayaquil. Se realizaron estudios en enero de 2011 en tres áreas de Guayaquil: norte (Capeira-Pantanal), sureste (Fundación Ecológica Andrade) y centro (Parque Histórico Guayaquil), los cuales abarcaban una gama de tipos de hábitat (jardines privados, parques, zonas urbanas, manglares y bosques) multidiversos; en estos sitios se muestraron 202 aves domésticas y silvestres para estudios serológicos, pero no se determinaron casos de VNO (25).

Sector Jaunecche: Es una zona pequeña situado en la parte norte de la Provincia de Los Ríos limitando al norte con el cantón de Mocache, Palenque al suroeste y el estero Peñafiel al Este; en este mencionado sector se encuentra una reserva de 130 hectáreas donde se encuentra la estación científica “Pedro Franco Dávila”, la misma que se encuentra dirigida y protegida por la Universidad de Guayaquil. En el sector antes señalado entre el 2007 al 2009 se muestraron 20 equinos con edades entre 3 a 7 años (26).

Humedal “Abras de Mantequilla”: Es un sitio RAMSAR de importancia nacional e internacional, que limita con las provincias del Guayas, Manabí, Bolívar, Cotopaxi y Pichincha; su jurisdicción la conforman los cantones Vinces, Pueblo Viejo y Baba, pertenece al bosque subhúmedo tropical y posee una superficie total de 67.177 hectáreas. Sus coordenadas geográficas son $1^{\circ} 28' 00''$ de latitud sur y $79^{\circ} 35' 00''$ de longitud oeste; además, la temperatura promedio anual es de 25°C , la humedad promedio es de 82% con máximas coincidentes con los meses más cálidos y la precipitación anual es de 1260 mm (27).

En el humedal Abras de Mantequilla, se realizaron dos estudios y en ambos, los animales fueron seleccionados según los siguientes criterios de inclusión: equino perteneciente a la zona de estudio o con estadía mayor a 21 días y mayores de 3 de meses de edad. Cabe señalar, que los animales en cuestión tenían propietarios y no eran caballos salvajes.

Además, se aplicó una encuesta, donde se registraron datos como identificación del animal, raza, sexo, edad, síntomas, vacunación y traslado de animales a otras zonas.

Es importante resaltar que solo en el primer estudio se realizaron estudios serológicos en 9 personas, cuyas edades se encontraban entre los 40 a 60 años de edad. El número de quinos muestrados en dicho humedal en los años 2007-2009 fue de 160 (26).

Recolección de muestras. Se censaron un total de 630 animales, y se realizó un muestreo dirigido de acuerdo al consentimiento de los propietarios de los equinos que desearon participar en el estudio. En el primer estudio realizado en Abras de Mantequilla, las muestras fueron tomadas entre septiembre a diciembre del 2007, obteniéndose un total de 160 muestras de suero sanguíneo de equinos y 9 muestras humanas, provenientes de 5 sectores del humedal que son: La Piedad, La Luz, Los Playones, Jobo y Mapancillo. En Jaunecche se tomaron 20 muestras de suero sanguíneo de equinos.

Respecto al segundo trabajo (solo Abras de Mantequilla), las muestras fueron tomadas entre el 5 de Enero al 22 de Diciembre del 2012, obteniéndose solo un total de 412 muestras de suero sanguíneo de equinos, los mismos que fueron colectados, en los sectores antes mencionados (36).

El criterio de selección de las áreas estudiadas se basó en características ornitológicas, para el primer estudio (lugares donde más llegan las aves migratorias, no presencia de caza y disponibilidad de alimento), y epidemiológicas, para el segundo estudio (presencia de casos).

Es importante mencionar que a los moradores de las Abras de Mantequilla en ambos estudios, se explicó sobre la importancia del estudio y el riesgo que tiene esta arbovirosis para el entorno; además, a las personas que participaron en ambos estudio se les solicitó el debido consentimiento informado. Por otro lado, previamente a la toma de la muestra en los equinos (en los dos estudios), se pidió el consentimiento informado a sus respectivos propietarios.

En los equinos la muestra fue extraída de la vena yugular y en los humanos de la vena humeral (a nivel de la flexura del codo), luego fueron transportadas entre 4 a 8°C al laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” (INH y MT “LIP”) de Guayaquil, para la búsqueda de anticuerpos contra VNO.

El INH y MT “LIP” durante los muestreos no contó con un comité de bioética, pero es meritorio destacar en el aspecto ético y legal, que el nombre de las personas sometidas al estudio no fueron publicados ni difundidos sus datos. Por otra parte a los dueños de los animales se realizó una manipulación debida y no se administró fármaco alguno; además, se comunicó que de resultar el diagnóstico positivo, se informaría inmediatamente para adoptar estrategias de prevención y control. De igual modo se procedió con los equinos del estudio.

Por otro lado, es meritorio destacar que las zonas estudiadas no eran de fácil acceso, montañosos, con muchas lagunas y animales silvestres.

Análisis de laboratorio. El suero se obtuvo mediante centrifugación, luego se transfirió a viales de 2 ml y se almacenó en congelación a -20°C hasta su posterior análisis. Las técnicas descriptas por la OIE para la detección del *VNO* son: RT-PCR en tiempo real, aislamiento en cultivo tisular, ELISA con IgM de captura, Neutralización por reducción de placas, Neutralización en suero e inmunohistoquímica (28). En el primer estudio se analizaron las muestras con el kit diagnóstico de ELISA de West Nile Virus IgM Capture de la casa PanBio[®] y se confirmaron por NTRP; por otro lado, para el segundo estudio se estudiaron las muestras por la prueba de ELISA de bloqueo y también se confirmaron por NTRP.

Técnicas de Laboratorio. Prueba de ELISA de West Nile Virus IgM Capture de la casa PanBio[®]: Los componentes de esta prueba son: antígeno recombinante (NY 99), conjugado (anticuerpo monoclonal anti WNV conjugado con peroxidasa), sustrato (tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno) y solución de parada (ácido fosfórico) (29).

Prueba de ELISA de bloqueo: La técnica fue optimizada con antígenos NY 99 (de marca FOCUS diagnostic), anti-Flavivirus conjugados con peroxidasa de rábano, Substrato ABTS y Solución Stop (ácido sulfúrico) (22,30).

Prueba de Neutralización por Reducción del Número de Placas: El primer estudio se realizó en el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Puerto Rico con los siguientes procedimientos: Las muestras fueron inactivadas con calor a 56°C durante 30 minutos, luego se realizaron diluciones seriadas dobles en solución tamponada con fosfato (PBS), con un 30% de suero fetal bovino inactivado por calor. Los sueros se diluyeron 1:20 con diluyentes (Chimera Vax WNV); también se usó células VERO, el virus NY 99, medios que contenían 10% de M199 sin phenol rojo, 1% de aminoácidos esenciales, 1% de vitaminas, 1% glutamina, FBS inactivado al 5%, gentamicina al 0,4%, sodio al 4%, bicarbonato, 0,6 de agarosa y la tinción se realizó con Rojo neutro (31).

El segundo trabajo la confirmación de las muestras se realizó en el laboratorio de arbovirus del Instituto de Virología “J. M. Vanella” de la Universidad de Córdoba (Argentina). Esta prueba se utilizó: células VERO, la cepa WNV E / 7229/06, se realizaron diluciones desde 1:10, pero se consideraron como positivas desde las diluciones 1:20 (15,32).

Resultados obtenidos de la búsqueda de *VNO* en Ecuador. De las investigaciones serológicas y virales de VNO realizadas en el 2003, en las Islas Galápagos en 69 aves endémicas (23), también, entre el 2003 y 2004, en 195 pingüinos (24), y las realizadas durante octubre de 2008, mayo de 2009, noviembre de 2010 y febrero de 2010 en la isla San Cristóbal (25), en aves vivas y muertas; no se determinaron ningún caso del virus en las especies referidas. En la ciudad de Guayaquil tampoco se evidenciaron casos de VNO (25); y en la actualidad no se ha reportado evidencia de casos, por parte de los organismos de Control de Salud Ecuatorianos (Ministerio de Salud Pública y Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario), ni por parte de investigadores particulares o institucionales.

Por otro lado, en Jaunecche de los 20 equinos muestrados no se detectó evidencia serológica del VNO, en contraste con el estudio realizado en el humedal “Abras de Mantequilla”, en donde de un total de 160 muestras analizadas de suero de equinos, 13 resultaron reactivas (7.22%) y de 9 humanos, 2 resultaron reactivos (22.22%) para anticuerpos tipo IgM contra el VNO por la técnica de ELISA desarrollada en el Subproceso de Virología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” (INH y MT “LIP”) de Guayaquil. Las muestras reactivas fueron analizadas por NTRP en el CDC de Puerto Rico, para confirmar la presencia de anticuerpos reactivos, encontrándose un total de 5 casos confirmados en equinos (2.77%) y ninguno en humanos (Tabla 1).

TABLA 1

Tabla 1. Estudio realizado en equinos y humanos de dos zonas seleccionadas del Ecuador.

Lugar de estudio	Fecha	Animales muestrados	Casos reactivos	Casos positivos	%
Jaunecche	2007	20 equinos	0.00	0.00	0.00
			13 equinos (22.22%)		
Abras de Mantequilla	2007	160 equinos y 9 humanos.	(8.12%) 2 humanos (22.22%)	5 equinos 0.00	3.12 0.00

Fuente: Coello Peralta RD, Diaz Castillo A, Medrano JB. (26).

Las 5 muestras seropositivas correspondieron a equinos provenientes del sector La Piedad con dos casos en machos, de cinco y siete años de edad; La Luz con un caso en macho y otro en una hembra, con edades de 2 y 6 años respectivamente; y un animal macho de Mapancillo de dos años de edad.

De los 412 muestras analizadas en el segundo estudio, 52 resultaron reactivas (12.6%) para anticuerpos IgM contra *WNV* por la técnica de ELISA de bloqueo en el laboratorio de Virología del INH “LIP” de Guayaquil (36), las muestras reactivas fueron confirmadas en el laboratorio de arbovirus del Instituto de Virología “J. M. Vanella” de la Universidad de Córdoba (Argentina), determinándose 43 casos confirmados, lo que permitió determinar una prevalencia en los equinos de las “Abras de Mantequilla” del 10.4% (Tabla 2).

TABLA 2

Tabla 2. Casos de VNO en equinos del segundo estudio en el humedal Abras de Mantequilla.

Casos de VNO	Equinos estudiados	Porcentaje (%)
Positivo	43	10.4
Negativo	369	89.6
Total	412	100.0

Las muestras positivas (confirmadas) correspondieron a equinos de las 5 zonas seleccionadas del humedal “Abras de Mantequilla”, presentándose en la Piedad 9 casos, 6 machos y 3 hembras; en La Luz 7 casos, 4 machos y 3 hembras; en Los Playones 10 casos, 7 machos y 3 hembras; en Jobo 8 casos, 4 machos y 4 hembras; y en Mapancillo 9 casos, 6 machos y 3 hembras. Los mencionados animales fueron de raza mestiza y no presentaron antecedentes de vacunación.

Es importante resaltar que la prevalencia final registrada en las Abras de Mantequilla fue del 6.76% (26,36).

Por otra parte, en el primer estudio realizado en el humedal “Abras de Mantequilla”, 3 animales presentaron síntomas similares a Fiebre Oeste del Nilo, en el segundo estudio no se presentaron síntomas, además en el primer estudio con respecto a sexo los machos se presentaron en un 56% y las hembras en un 44%, en el segundo estudio los machos se mostraron en un 60% y las hembras en un 40%. Pero, en los dos estudios coincidieron con respecto a las edades (entre 3 meses a 12 años), raza mestiza, sin antecedentes

de vacunación y el 90% de los propietarios de los animales manifestaron que sus caballos si se trasladan a diferentes sitios (26).

DISCUSIÓN

El VNO es uno de los flavivirus más ampliamente distribuido en el mundo y con actividad emergente en las Américas, desde 1999 (33).

La ausencia de actividad viral en Galápagos, Guayaquil y Jaúneche se presume por la no introducción de aves migratorias infectadas o enfermas a estos sitios de gran impacto ecológico del Ecuador y del mundo; por otra parte, no hay datos actualizados publicados de la búsqueda de anticuerpos en suero de mamíferos (humanos, equinos) o aves.

El 3.12% y el 10.4% de evidencia serológica obtenidos en el primer y el segundo estudio respectivamente, determinaron una seroprevalencia del 6.76%, en los equinos del humedal “Abras de Mantequilla” del Ecuador, la misma que se encuentra entre los parámetros de seroprevalencia reportadas en equinos de Latinoamérica (1 al 16%) (19), utilizando las mismas técnicas de laboratorio (ELISA y NTRP), además, los anticuerpos confirmados (IgM) indican infección reciente, lo que evidencia la permanente actividad del VNO en dichas zonas.

En países sudamericanos se registran seroprevalencias en equinos del 5 y 9% en Colombia (17,34); Venezuela 4% (18); Brasil 3% (20) y 8% (35); Uruguay 2% (21) y Argentina el 16% (19).

Respecto al sexo, las razas y edades estudiadas en los equinos, la literatura científica indica que no existe predisposición para infectarse con VNO (33).

Además, los animales estudiados no presentaron antecedentes de vacunación, pero 3 animales (del primer estudio) resultaron con sintomatología, similar a Fiebre Oeste del Nilo en equinos con presencia de fiebre, debilidad, decaimiento y postración, estos mismos animales fueron reactivos y positivo para *VNO*, pero no murieron. Estos animales son pruebas fehacientes de que el virus en el Ecuador está circulando de manera desapercibida.

Por otra parte, las zonas de las Abras de Mantequilla son sitios de gran impacto silvestre ya que se encuentra una gran variedad de ecosistemas, donde llegan una gran diversidad de aves migratorias, lo que pondría conllevar a un serio problema de vida silvestre, salud animal y humana; además, las zonas estudiadas son rutas que siguen las aves en su migración durante la época fría en los países de Norteamérica, lo cual constituye un factor de riesgo para la transmisión de diversos arbovirus (27,36).

En conclusión se determinó la presencia y circulación del VNO en equinos del Ecuador, en el caso de los humanos no se confirmaron los casos (no concluyentes). Desde el punto de vista de salud animal y pública, el sitio donde se encontró la presencia serológica del virus, es un sitio ecológico a nivel nacional e internacional de alto impacto, debido al alto número de especies aviares migratorias; además, se concluye que es evidente el riesgo en vida silvestre, salud animal y podría convertirse en un serio problema de salud pública, ya que el virus puede producir meningoencefalitis en equinos y humanos.

CONFLICTO DE INTERÉS.

Los autores declaramos no tener conflicto de intereses de ninguna índole.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Elizabeth Hunsperger del CDC de Puerto Rico, a la Dra. Lorena Spinsanti del Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella de la Universidad Nacional de Córdoba, al Dr. Ernesto Gutiérrez Vera, Blgo. Leandro Patiño y

al Subproceso de Virología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” de Guayaquil.

REFERENCIAS

1. Beck C, Jimenez MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparc I. Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10 (11):6049-6083. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph10116049> PMid:24225644
2. Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O’Leary D, Murray K, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med.* 2001; 344(24):1807-1814. <https://doi.org/10.1056/NEJM200106143442401> PMid:11407341
3. Anderson JF, Andreadis TG, Vossbrinck CR, Tirrell S, Wakem EM, French RA, et al. Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper’s hawk in Connecticut. *Science.* 1999; 286(5448):2331-2333. <https://doi.org/10.1126/science.286.5448.2331> PMid:10600741
4. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science.* 1999; 286(5448):2333-2337. <https://doi.org/10.1126/science.286.5448.2333> PMid:10600742
5. Garcia MN, Hasbun R, Murray KO. Persistence of West Nile virus. *Microbes Infect.* 2015; 17(2):163-168. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.12.003> PMid:25499188
6. Bhuvanakantham R, Cheong YK, Ng ML. West Nile virus capsid protein interaction with importin and HDM2 protein is regulated by protein kinase C-mediated phosphorylation. *Microbes Infect.* 2010; 12(8-9):615-625. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.04.005> PMid:20417716
7. Brinton MA. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56:371-402. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160654> PMid:12142476
8. Takahashi H, Ohtaki N, Maeda-Sato M, Tanaka M, Tanaka K, Sawa H, et al. Effects of the number of amino acid residues in the signal segment upstream or downstream of the NS2B-3 cleavage site on production and secretion of prM/M-E virus-like particles of West Nile virus. *Microbes Infect.* 2009; 11(13):1019-1028. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.07.009> PMid:19647801
9. Reisen WK. Ecology of West Nile Virus in North America. *Viruses.* 2013; 5(9):2079-105. <https://doi.org/10.3390/v5092079> PMid:24008376
10. Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, Singer DA, Nash D, Cooper MJ, et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet.* 2001; 358(9278):261-264. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05480-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05480-0)
11. Díaz LA, Quaglia A, Flores FS, Contigiani MS. Virus West Nile en Argentina: un agente infeccioso emergente que plantea nuevos desafíos. *El hornero.* 2011; 26(1):5–28. https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/hornero/hornero_v026_n01_p005.pdf
12. Hart J, Jr., Tillman G, Kraut MA, Chiang HS, Strain JF, Li Y, et al. West Nile virus neuroinvasive disease: neurological manifestations and prospective longitudinal outcomes. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:248. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-248> PMid:24884681
13. Castillo-Olivares J, Wood J. West Nile virus infection of horses. *BMC Vet Res.* 2004; 35(4):467-483. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004022> PMid:15236677
14. Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int.* 2015:1-20. <https://doi.org/10.1155/2015/376230> PMid:25866777
15. Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(10):1559-1561. <https://doi.org/10.3201/eid1210.060852> PMid:17176571
16. Komar N, Clark GG. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica.* 2006; 19(2):112-127. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892006000200006> PMid:16551385

17. Mattar S, Edwards E, Laguado J, Gonzalez M, Alvarez J, Komar N. West Nile virus antibodies in Colombian horses. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(9):1497-1498. <https://doi.org/10.3201/eid1109.050426> PMid:16673523
18. Bosch I, Herrera F, Navarro JC, Lentino M, Dupuis A, Maffei J, et al. West Nile virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(4):651-653. <https://doi.org/10.3201/eid1304.061383> PMid:17561567
19. Tauro L, Marino B, Diaz LA, Lucca E, Gallozo D, Spinsanti L, et al. Serological detection of St. Louis encephalitis virus and West Nile virus in equines from Santa Fe, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(4):553-556. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400019> PMid:22666870
20. Pauvolid-Correia A, Morales MA, Levis S, Figueiredo LT, Couto-Lima D, Campos Z, et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(4):467-474. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000400014> PMid:21739036
21. Burgueno A, Spinsanti L, Diaz LA, Rivarola ME, Arbiza J, Contigiani M, et al. Seroprevalence of St. Louis encephalitis virus and West Nile virus (Flavivirus, Flaviviridae) in horses, Uruguay. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:582957. <https://doi.org/10.1155/2013/582957> PMid:24490165
22. Faggioni G, De Santis R, Pomponi A, Grottola A, Serpini GF, Meacci M, et al. Prevalence of Usutu and West Nile virus antibodies in human sera, Modena, Italy, 2012. *J Med Virol.* 2018 <https://doi.org/10.1002/jmv.25230>
23. Travis EK, Vargas FH, Merkel J, Gottdenker N, Miller RE, Parker PG. Hematology, plasma chemistry, and serology of the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*) in the Galapagos Islands, Ecuador. *J Wildl Dis.* 2006; 42(1):133-141. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.1.133> PMid:16699155
24. Travis EK, Vargas FH, Merkel J, Gottdenker N, Miller RE, Parker PG. Hematology, serum chemistry, and serology of Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) in the Galapagos Islands, Ecuador. *J Wildl Dis.* 2006; 42(3):625-632. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.3.625> PMid:17092893
25. Eastwood G, Goodman SJ, Hilgert N, Cruz M, Kramer LD, Cunningham AA. Using Avian Surveillance in Ecuador to Assess the Imminence of West Nile Virus Incursion to Galápagos. *EcoHealth.* 2014; 11(1):53-62. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-0911-5> PMid:24796792
26. Coello Peralta RD, Diaz Castillo A, Medrano JB. Detección del Virus del Nilo Occidental en Equinos del Ecuador: Primera presencia serológica del virus del Nilo Occidental en equinos de humedales en el Ecuador: 2007-2009. ed. Madrid - España: Editorial Académica Española; 2016.
27. Ministerio del Ambiente del Ecuador. Humedales del Ecuador. Quito - Ecuador: 2018 [cited 20-06-2018]. URL Available in: <http://suia.ambiente.gob.ec/web/humedales/documentos>
28. (OIE) Organización Mundial de Sanidad Animal. Fiebre del Nilo Occidental. Paris - Francia: OIE; 2013 [cited 13-03-2018]. URL Available in: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.24_WEST_NILE.pdf
29. 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(2):727-733. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.727-733.2004> PMid:14766844
30. Blitvich BJ, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero JF, Marlenee NL, Gonzalez-Rojas JI, Komar N, et al. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(7):853-856. <https://doi.org/10.3201/eid0907.030166> PMID: 12890327
31. Barrera R, Hunsperger E, Munoz-Jordan JL, Amador M, Diaz A, Smith J, et al. First isolation of West Nile virus in the Caribbean. *The Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78(4):666-668. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.666> PMid:18385366
32. Earley E, Peralta PH, Johnson KM. A plaque neutralization method for arboviruses. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1967; 125(3):741-747. <https://doi.org/10.3181/00379727-125-32194> PMid:15938255
33. Vázquez González a. Busqueda de flavivirus en mosquitos de humedales espa-oles: análisis moleculares del virus west nile y Otros flavivirus. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2010.
34. Mattar S, Komar N, Young G, Alvarez J, Gonzalez M. Seroconversion for West Nile and St. Louis encephalitis viruses among sentinel horses in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(8):976-979. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000800012> PMid:22241119

35. Melandri V, Guimaraes AE, Komar N, Nogueira ML, Mondini A, Fernandez-Sesma A, et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107(8):1073-1075. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000800020> PMid:23295763
36. Coello Peralta RD, González González M, Martínez Cepeda GE. Coinfection of two arboviruses (VNO and VESL) in equids of the “Abras de Mantequilla” wetland, Ecuador. J Electr Vet. 2018; 19(6):1-12. URL Available in: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060618/061809.pdf>