UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

Evidencia serológica del virus del nilo occidental en equinos (*Equus caballus*), en el área natural protegida laguna El Jocotal, departamento de San Miguel, El Salvador.

POR:

Br. Marcela Natalia Escalante Hernández

Br. Gabriela Alejandra Quintanilla Moreno

CIUDAD UNIVERSITARIA, SEPTIEMBRE DE 2016.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA

Evidencia serológica del virus del nilo occidental en equinos (*Equus caballus*), en el área natural protegida laguna El Jocotal, departamento de San Miguel, El Salvador.

POR:

Br. Marcela Natalia Escalante Hernández

Br. Gabriela Alejandra Quintanilla Moreno

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, SEPTIEMBRE DE 2016

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR INTERINO:

LIC. JOSÉ LUIS ARGUETA ANTILLÓN.

SECRETARIA GENERAL:

DRA. ANA LETICIA ZAVALETA DE AMAYA.

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO:

ING. AGR. M. Sc. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA

SECRETARIO

ING. AGR. M. Sc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA

F. _____

M.V.Z. ROSY FRANCIS ALVARENGA ARTIGA.

DOCENTES DIRECTORES

F. _____

M.V.Z. CARLOS DAVID LÓPEZ SALAZAR.

F. _____

M.V.Z. LUIS ERNESTO ROMERO PÉREZ.

F. _____

M.V.Z. NÉSTOR ODIR AVENDAÑO ROMERO.

COORDINADORA GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN

F. _____

M.V.Z. MARÍA JOSÉ VARGAS ARTIGA.

RESUMEN.

La investigación se realizó en el área natural protegida laguna El Jocotal, perteneciente al departamento de San Miguel, El Salvador; el complejo comprende los cuerpos de agua laguna El Jocotal y laguna Agua Caliente mejor conocida como laguna de Chilanguera. Las unidades experimentales fueron 91 caballos *(Equus caballus)* de la periferia de ambos humedales en un perímetro no mayor de 5km a la redonda de cada cuerpo de agua, dispersas en 29 unidades productivas. La fase de campo se desarrolló en el período comprendido de septiembre a diciembre de 2015, con el propósito de evidenciar serológicamente la presencia o ausencia de anticuerpos específicos del Virus del Nilo Occidental (VNO) en muestras de suero analizadas por un ensayo inmunoenzimático de bloqueo (ELISA). Se estableció la distribución geográfica de la población equina susceptible mediante el uso del sistema de geoposicionamiento global (GPS) y por imagen de mapa mediante el software ArcGis. Las muestras fueron procesadas en la Red de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) de El Salvador. Los resultados del ELISA de bloqueo, permiten establecer la seroprevalencia en equinos más elevada en Latinoamérica, encontrándose seropositividad en un 89% frente al virus del Nilo Occidental, mientras que un 4.40% resultó seronegativo y el restante 6.60% reflejó una respuesta serológica sospechosa; con los datos de las coordenadas geográficas se generaron mapas de distribución espacial de los animales seropositivos frente al VNO, rutas de acceso, concentración de poblaciones humanas y equinas, aportando datos actualizados sobre la epidemiología del VNO en la zona.

Palabras clave*: Virus del Nilo Occidental, Seroprevalencia VNO, laguna El Jocotal El Salvador, ELISA de bloqueo,* Anticuerpos.

ABSTRACT.

This research has been conducted in the protected area called: lagoon El Jocotal. This Laggon is located in the department of San Miguel, El Salvador. This area is made by: El Jocotal lagoon and Agua Caliente lagoon best known as Chilanguera lagoon. The experimental units were 91 horses *(Equus caballus)* within the perimeter of no more than 5km radius of each wetland, dispersed in 29 production units. The field phase took place from september to december 2015. The purpose of serologically detect the presence or absence of specific antibodies to West Nile virus (WNV) in serum samples analyzed by an enzyme immunoassay lock (ELISA). Geographical distribution of the susceptible equine population was established using the global system (GPS) and map image by ArcGis software. Samples were processed at the Red de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) de El Salvador. The outcomes of the blocking ELISA, allow you to set the highest seroprevalence in equines in Latin America, being 89% seropositivity against West Nile virus, while a 4.40% were seronegative and the remaining 6.60% reflected a suspicious serological response. In this regard, with data from the geographical coordinates of spatial distribution maps of seropositive animals against WNV, paths, gathering of human and equine populations, providing an updating epidemiology of WNV within the region.

Key words: *West Nile Virus, WNV Seroprevalence, El Jocotal lagoon El Salvador, Blocking ELISA, Antibodies.*

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad de El Salvador por el aporte de conocimientos y por la formación profesional adquirida en los años de estudio.

Al Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) por abrirnos las puertas y apoyarnos en las fases de campo y laboratorio.

Al Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) por su valiosa donación de la prueba diagnóstica empleada en la investigación.

Al Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN) por su disponibilidad y el acompañamiento a la zona de estudio durante la fase de campo.

A los asesores directores Dr. Carlos David López, Dr. Luis Romero y Dr. Néstor Avendaño, por su valioso apoyo, tiempo, paciencia y dedicación; gracias por ser guías compartiendo sus conocimientos y experiencias.

Finalmente, a todas las personas que colaboraron directa e indirectamente para la realización de esta investigación ¡muchas gracias!

Marcela Escalante.

Gabriela Quintanilla.

DEDICATORIA.

Dedico este trabajo a las personas más importantes en mi vida:

A mis padres Ana María de Escalante y Manuel Escalante

Gracias por su amor y comprensión y sacrificio este logro no lo hubiese logrado sin ustedes.

A mi querida hermana Laura gracias por tu apoyo y amor.

A compañero, amigo, novio y esposo, Josué por darme el impulso y aliento que necesito siempre.

A mi hijo Mateo, mi amor: “no me quitaste mi futuro me diste uno nuevo y mejor”

A ti mi tío Edgar gracias por demostrarme que el amor a la familia y la Fe en Dios debe de ser más grande en los momentos más difíciles, porque esta meta cumplida es en su nombre, gracias por ser uno de los grandes ejemplos para toda mi vida.

Y por último, Gabriela gracias por acompañarme y trabajar juntas durante este proceso por ser no mi compañera si no mi amiga de tesis y para siempre.

Dedico esta investigación a cada uno de ustedes con mucho amor y cariño.

Marcela Escalante.

DEDICATORIA.

Es mi deseo como sencillo gesto de agradecimiento dedicar ésta investigación con la cual culmino mi proceso de formación profesional como Médico Veterinaria y Zootecnista, inicialmente a mi madre Rosa Moreno, quien con un valor incalculable, amor, paciencia y aliento me ha visto crecer, permitiéndome escoger los senderos en la aventura de la vida, y a pesar de los triunfos y tropiezos, siempre ha estado ahí de forma incondicional, con un deseo enorme de verme crecer en la vida, llegándose a la fecha uno de esos días.

A mi padre Ricardo Quintanilla por darme su apoyo para llegar a ser una profesional, por demostrar con su ejemplo que hay que luchar por mis ideales y que el mejor legado que puede darse a un hijo es el conocimiento.

A mi pareja y amigo Antonio Flores por ser mi apoyo, compañía y aliento, por darme ánimos y recordarme a diario con una dosis de amor que estamos luchando juntos en éste camino, evolucionando, creciendo, cumpliendo metas, y viviendo sueños, gracias por ser mi motivo.

A mi amiga y compañera Marcela Escalante por recorrer juntas ésta travesía y ser una mujer fuerte y digna de admirar. Gracias por todo, lo hemos logrado.

A mis estimados asesores y maestros de tesis Dr. Carlos David López, Dr. Luis Romero y Dr. Néstor Avendaño por aportarnos sus valiosos conocimientos e invertir su tiempo en las diferentes fases de la investigación.

A mis queridos maestros Dra. Ethel Fernández, Dr. Carlos David López, Ing. Homero López, Ing. Edgardo Corea e Ing. Ludwing Leyton por ser valiosos guías en éste proceso de crecimiento personal y profesional, les admiro y estimo por sus cualidades en particular y el apoyo brindado en mi formación como Médico Veterinaria.

GRACIAS A DIOS POR LAS BENDICIONES DE LA VIDA.

Gabriela Quintanilla.

ÍNDICE

RESUMEN iv

1 INTRODUCCIÓN. 1

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. 2

2.1 Antecedentes. 2

2.2 Antecedentes en Latinoamérica. 3

2.3 Características de la familia *Flaviviridae*. 5

2.3.1 Genoma y estructura viral. 5

2.3.2 Replicación. 7

2.4 Sinonimias. 7

2.5 Clasificación genética. 7

2.6 Distribución geográfica. 9

2.7 Período de incubación. 9

2.8 Transmisión. 9

2.8.1 Vectores mosquitos. 10

2.8.2 Transmisión no mediada por mosquitos. 12

2.8.3 Otros vectores involucrados en la transmisión del VNO. 13

2.9 Hospederos aviares. 13

2.9.1 Especies afectadas. 13

2.9.2 Viremias. 14

2.9.3 Patogénesis aviar. 15

2.9.4 Signos clínicos en aves. 15

2.10 Infecciones en equinos y hospederos no aviares. 15

2.10.1 Patogenia en equinos. 16

2.10.2 Manifestaciones clínicas en équidos. 17

2.10.3 Lesiones post mortem. 17

2.11 Tratamiento. 18

2.12 Inmunidad y reemergencia. 18

2.13 Mortalidad. 19

2.14 Vacunación en equinos. 19
2.15 Importancia del VNO en salud pública. 19
2.15.1 Mortalidad y letalidad en humanos. 20
2.15.2 Tratamiento en humanos. 21
2.16 Pruebas diagnósticas. 21
2.16.1 Identificación del agente. 21
2.16.2 Pruebas serológicas. 22
2.17 Diagnóstico diferencial. 23
2.18 Migración de aves y diseminación del VNO. 23
2.18.1 Aves de El Salvador: estado actual de conocimiento. 25
2.18.2 Estado de las especies de aves registradas en El Salvador. 25
2.19 Humedales RAMSAR de El Salvador. 25
2.19.1 Laguna el jocotal. 26
2.20 Vigilancia epidemiológica del VNO. 26
2.20.1 Estrategias de vigilancia de las encefalitis equinas. 27
2.20.2 Lineamientos para la vigilancia epidemiológica del virus de la fiebre del Oeste del Nilo en El Salvador. 28
2.20.3 Perspectiva futura. 29
3 MATERIALES Y MÉTODOS 29
3.1 Metodología de campo. 30
3.1.1 Técnica muestreo. 31
3.1.2 Georreferenciación. 31
3.2 Metodología de laboratorio. 31
3.2.1 Fundamento técnico del kit. 31
3.2.2 Composición del Kit. 32
3.2.3 Procedimiento. 32
3.2.4 Procedimiento. 33
3.2.5 Lectura e interpretación de resultados. 34
3.3 Metodología estadística. 34

3.3.1 Seroprevalencia. 34
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 35
5 CONCLUSIONES. 40
6 RECOMENDACIONES. 41
7 BIBLIOGRAFÍA. 42
8 ANEXOS 47

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Componentes de la estrategia de la vigilancia de las EE. 27

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Organización del genoma y composición del virión. 6
Figura 2. Distribución mundial del virus del Nilo Occidental. 9
Figura 3. Ciclo de trasmisión VNO. 10
Figura 4. Ubicación geográfica de los cuerpos de agua laguna El Jocotal y laguna Agua Caliente con sus respectivas unidades productivas. 35
Figura 5. Resultados del diagnóstico serológico frente al virus del Nilo Occidental en caballos del área natural protegida laguna El Jocotal. 36
Figura 6. Distribución de las unidades productivas con equinos seropositivos a un perímetro de 5 km de los cuerpos de agua laguna El Jocotal y laguna Agua Caliente. 39

INDICE DE ANEXOS CUADROS

Cuadro A-1. Encefalitis virales trasmitidas por vectores de importancia en Latinoamérica. 48
Cuadro A-2. Enfermedades diferenciales de las encefalomielitis equinas 49
Cuadro A-3. Listado de aves identificadas en el humedal laguna el Jocotal, que son competentes en la trasmisión al VNO. 53
Cuadro A-4. Detención temprana de casos con síndrome neurológicos en equinos. 54
Cuadro A-5. Caracterización y monitoreo de riesgo estudios seroprevalencia en humanos. 55
Cuadro A-6. Estudios entomológicos 56
Cuadro A-7. Detencción de mortalidades en aves silvestres. 57
Cuadro A-8. Circulación viral en reservorios silvestres y centinelas. 58
Cuadro A-9. Sitios centinelas para la vigilancia entomológica y animal (equinos y aves) de la fiebre del Oeste del Nilo. 59

INDICE DE ANEXOS FIGURAS.

Figura A- 1. Árbol filogenético del VNO. 47
Figura A- 2. Principales rutas migratorias en el continente Americano. 50
Figura A- 3. Porcentaje de especies aviares de acuerdo a su estado para El Salvador.. 51
Figura A- 4. Sitios Ramsar El Salvador. Se señala el área natural protegida laguna El Jocotal. 52
Figura A- 5. Fotografía laguna El Jocotal. 60
Figura A- 6. Censo de población equina. 60
Figura A- 7. Toma de muestras equinas. 60
Figura A- 8. Punción vena yugular. 61
Figura A- 9. Muestras de sangre en reposo para obtención del suero. 61
Figura A- 10. Muestra serológica depositadas en crioviales. 61
Figura A- 11. Solución de frenado para dilucidar reacción colorimétrica. 62
Figura A- 12. Lectura de valores de absorbancia 62
Figura A- 13. Clasificación del sexo de los equinos y resultados serológicos. 63
Figura A- 14. Categoría de edades y resultados serológicos. 63
Figura A- 15 Manejo de los equinos y resultados serológicos……..……..65

1 INTRODUCCIÓN.

El virus del Nilo Occidental es un virus aviar zoonótico transmitido por mosquitos, que puede cursar con enfermedad neurológica y eventualmente fatal en algunas especies de mamíferos incluyendo seres humanos, reptiles y aves. La mayoría de los casos clínicos se producen en humanos y caballos que son hospedadores finales del virus (CFSPH/IICAB, 2010), razón por la cual se ha convertido en un problema de salud pública al encontrarse en el continente americano los vectores, reservorios, condiciones ecológicas y hábitats propicios para la presentación de su ciclo de transmisión. Las rutas de aves migratorias favorecen la diseminación del virus en todo el continente.

Desde el aparecimiento de los primeros casos del virus en Norteamérica en 1999, el VNO se diseminó hacia Centroamérica, Suramérica y el Caribe. En El Salvador el primer reporte de VNO en equinos corresponde a diez muestras positivas por medio de la prueba de neutralización por reducción en placas en el 2003 (Cruz, 2003); sin embargo, el mismo año, otro estudio a cargo de los Servicios Veterinarios nacionales en 2003, no reportó serología positiva en 116 muestras evaluadas mediante ELISA de captura. A pesar de que El Salvador es miembro de la OIE y el VNO está incluido en lista de las enfermedades de declaración obligatoria a partir del 2006, hasta la fecha no se había reportado evidencia del VNO en la base de datos del sistema mundial de información zoosanitaria (WAHID) de la OIE por no contar con un estudio oficial que demostrara evidencia serológica del virus.

A raíz de la discrepancia en las dos investigaciones desarrolladas en el año 2003, y ante la necesidad de realizar vigilancia epidemiológica de éste virus en el país, retoma especial importancia generar información actualizada que permita dilucidar el estatus de la epidemiología del virus.

Los resultados de serología y georreferenciación generados en ésta investigación, permiten establecer la situación epidemiológica actual de la población equina que habita en la periferia del humedal laguna El Jocotal, por lo cual la información será de utilidad en la toma de decisiones relacionada a acciones de vigilancia epidemiológica, prevención y control, de la enfermedad en humanos y animales al considerar al equino como animal centinela de la enfermedad. Éste estudio se convierte en el primer reporte oficial del VNO en equinos de un humedal RAMSAR en el país, que además es un precedente para posteriores estudios por parte de las autoridades competentes en materia de salud pública, sanidad animal y ambiental de El Salvador.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Antecedentes.

El virus del Nilo Occidental (VNO) fue aislado por primera vez en una mujer adulta en el Distrito del Nilo Occidental de Uganda en África Oriental en 1937. Las primeras epidemias registradas de Fiebre del Nilo Occidental (FNO) ocurrieron en Israel durante los años cincuenta. Posteriormente, se observó su presencia en Egipto, Israel, India y algunas áreas de África. En 1974 la epidemia registrada de mayor magnitud causada por el VNO ocurrió en Sudáfrica. Han ocurrido brotes recientes de la encefalitis vírica del Nilo Occidental en seres humanos en Argelia en 1994, Rumania en 1996 -1997, República Checa en 1997, República Democrática del Congo en 1998, Rusia en 1999, Estados Unidos en 1999 – 2000 e Israel en 2000 (OPS, 2000).

Hasta 1999 el VNO sólo se encontraba en el hemisferio oriental. En el continente americano durante el verano y otoño de 1999, se identificó el VNO en aves muertas en el zoológico de Bronx y sus alrededores y al mismo tiempo se identificaron varios casos de encefalitis en humanos y equinos, notificándose un total de 62 casos de enfermedad neurológica y 7 defunciones de personas en el área metropolitana de Nueva York (CFSPH/IICAB, 2010). Los científicos junto con los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), sospechaban que el VNO estaba presente a comienzos del verano de 1999. El origen del virus no está claro, pero las cepas de los Estados Unidos Americanos (EUA) se asemejan bastante a las cepas del virus de Israel. Una posibilidad es que, de casualidad, se haya traído en un avión a los EUA un mosquito infectado desde un área endémica; otra quizá la situación más probable, es que ingresó al país un ave importada infectada que no presentaba síntomas, o en un ave que se haya desviado de la migración (CFSPH/IICAB, 2010).

En Ames Iowa los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios (NVSL) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, aislaron el virus del tejido de las aves y después de descartar que se tratara de diversos agentes virales que causan encefalitis en las aves, realizaron una microscopía electrónica para examinar su estructura. El 20 de septiembre de 1999, los NVSL enviaron cultivos del virus a los CDC para su identificación y caracterización. Las pruebas en los CDC del 23 de septiembre indicaron que lo aislado se relacionaba estrechamente con el VNO, que nunca había sido aislado en el hemisferio occidental (CFSPH/IICAB, 2010). Desde 1999 el VNO se ha propagado hacia el norte de Canadá y al sur, hacia América Central, Suramérica y el Caribe. Desde enero de 2009, hay evidencia de la existencia

de éste virus en lugares tan australes como Colombia, Argentina y Venezuela (CFSPH/IICAB, 2010).

2.2 Antecedentes en Latinoamérica.

México estuvo en riesgo de la introducción del virus desde su aparición en Estados Unidos, pero no fue sino hasta el año 2002 cuando se reportaron los primeros casos en aves y caballos. El primer reporte sobre la circulación del VNO se publicó en el año 2002 en dos estudios serológicos independientes que se hicieron en caballos en Coahuila y Yucatán (Ramos y Falcón, 2004). En Coahuila se utilizó la prueba de ELISA de bloqueo y Neutralización por Reducción de Placas (NRP), y los resultados fueron concordantes. Quince (62,5%) caballos fueron considerados seropositivos para el virus del Nilo Occidental por NRP. La tasa de seropositividad asintomática fue alta, con 10 (66,7%) de los 15 caballos infectados con el VNO que no mostraron signos de enfermedad (Blitvich *et al.*, 2003).

El estado de Yucatán es un punto de incursión de este virus en América Latina probablemente porque esta zona es una tocar tierra principal para muchas especies de aves que migran desde el noreste y el medio oeste de Estados Unidos. Se obtuvieron muestras de suero de 252 caballos; los anticuerpos contra el VNO se detectaron en tres (1.2%) caballos, mediante ensayos inmunoenzimáticos, confirmado por NRP (Loroño *et al.*, 2003).

La Secretaría de Salud de México (SSA) citada por Cortés Guzmán, 2013, en el año 2003 examinó 441 muestras de sueros de equinos de 14 estados, de los cuales 6 estados resultaron seropositivos (Veracruz, Tabasco, Yucatán, Chihuahua, Coahuila y Tamaulipas). En 22% de las muestras se detectaron anticuerpos específicos del VNO.

En Guatemala entre septiembre de 2003 a marzo de 2004 se colectaron muestras de sueros de caballos procedentes de 19 departamentos, se tomaron muestras sólo de caballos sanos. Antes de 2005, las vacunas equinas para VNO no estaban disponibles; como tal, la reactividad cruzada debido a la vacunación previa era muy poco probable. Las muestras se ensayaron inicialmente para anticuerpos contra el VNO por ELISA de bloqueo. Un subconjunto de muestras positivas fue confirmado por prueba de NRP; de 352 muestras, 149 (42.3%) dieron positivos con el anticuerpo monoclonal específico 3.1112G VNO. De 70 muestras positivas al ELISA de bloqueo; las pruebas de neutralización indicaron 9 positivas al VNO al VNO, 33 para el virus de la encefalitis de San Luis y 21 para flavivirus indiferenciados (Morales *et al.,* 2006).

De 2004 a 2005 se monitoreó la transmisión del VNO en pollos centinelas en siete departamentos de Guatemala (Petén, Alta Verapaz, Izabal, Zacapa, Santa Rosa y Escuintla); seroconversiones en pollos proporcionaron evidencia de transmisión del virus solamente en el departamento de Izabal. Seguidamente se desarrolló un seguimiento de la estacionalidad de transmisión del VNO en Puerto Barrios, Izabal por muestreos mensuales de bandadas de aves en 10 sitios de muestreo; anualmente se registraron seroconversiones al VNO y, sólo se produjo durante el período de mayo a octubre. En zonas urbanas y rurales se identificó que *Cx. quinquefasciatus* representa el mayor riesgo para la transmisión del virus a los seres humanos y caballos tras aumentos en la densidad de población en los meses de mayo y junio (Morales *et al.*, 2013).

La primera evidencia del VNO en Costa Rica fue a través de un estudio serológico de 101 muestras de caballos realizado en 2004, reveló una seroprevalencia del 27.7% en caballos de la península de Nicoya, utilizando un ELISA de bloqueo específico para VNO (Hobson *et al*., 2004).

En Argentina, en febrero del 2006, se aísla el virus a partir de muestras de cerebro de tres caballos con diagnóstico de encefalitis, los cuales pertenecían a diferentes haras de la parte central del país (Morales *et al., 2006)*; En Venezuela, se analizaron muestras de sueros de equinos y aves, colectadas entre febrero 2004 y mayo de 2006, utilizando el ELISA de captura de anticuerpos tipo IgG contra el VNO y confirmada por la NRP; se encontró que de un total de 791 sueros de caballos y 576 sueros de aves muestreados en 33 municipios del país, 34 resultaron positivos en equinos y 5 en aves residentes, como primera evidencia de circulación local y amplia diseminación en Venezuela (Bosch *et al.,* 2007).

En otro estudio serológico en el año 2013 se obtuvieron un total de 102 muestras de suero de equinos en tres sitios de estudio del estado de Guerrero, México estableciendo una seroprevalencia de 18.6%. Cinco (15.6 %) de un total de 32 equinos resultaron seropositivos en Acapulco, 11 (19.3 %) de un total de 57 en Ometepec y tres (23.1 %) de un total de 13 en José Azueta (Cortés, 2013).

En El Salvador en los años 2001 al 2003, se realizó una investigación a causa de brotes de encefalitis y defunciones equinas en los departamentos de Ahuachapán, La Libertad, La Paz, Chalatenango, Cabañas y Usulután. La investigación fue llevada a cabo por médicos epidemiólogos del MINSAL; se muestrearon humanos, y equinos algunos de los cuales presentaban sintomatología neurológica*,* al mismo tiempo se llevaron a cabo muestreos larvarios. Las pruebas de laboratorio en equinos fueron

inhibición de hemaglutinación, NRP al 50% y 90%, IgG e IgM para la encefalitis equina viral (EEV) y cultivo de sueros y cerebro. En muestras humanas se hicieron pruebas para identificación del VNO, EEV, dengue y fiebre amarilla. En equinos resultaron positivas 10 de 51 muestras al VNO por medio de NRP al 90%, no hubo aislamiento viral, y los resultados de las muestras procedentes de personas fueron negativas (Cruz, 2003).

Los resultados de las investigaciones entomológicas realizadas en el municipio de Berlín reportaron gran número de larvas y adultos de *Culex pipiens quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* (índice de casa 20%). *Cx. Pipiens quinquefasciatus* se encuentra en altas densidades en las estaciones secas en El Salvador (Cruz, 2003).

Siempre en El Salvador en mayo del 2003, el MAG envió un total de 116 muestras de sueros equinos para su análisis a los laboratorios nacionales de servicios veterinarios en Ames Iowa en Estados Unidos, resultando negativas por medio de la prueba de captura de anticuerpos IgM de ELISA y aislamiento viral para el VNO (Servicios Veterinarios MAG, 2003)

2.3 Características de la familia *Flaviviridae*.

La familia Flaviviridae (flavus= del latín, amarillo), en alusión al virus de la fiebre amarilla (Stanchi, 2007); está compuesta por los géneros *Flavivirus, Pestivirus y Hepacivirus*. El género *Flavivirus* contiene unos 70 virus, de los cuales 10 tienen importancia en medicina veterinaria. Alrededor de unos 30 miembros de este género son transmitidos por artrópodos. Otros flavivirus, como el virus de la fiebre amarilla, los cuatro tipos de virus dengue, el virus de la encefalitis de San Luis, se encuentran entre los virus más importantes que originan enfermedades infecciosas en el ser humano (Vadillo *et al*., 2002).

El virus del Nilo Occidental pertenece al serocomplejo de la encefalitis japonesa junto con los virus Cacipacora, Koutango, encefalitis japonesa, encefalitis de San Luis, encefalitis Murray Valley, Usuto y Yaounde (OPS *et al*., 2013).

2.3.1 Genoma y estructura viral.

Estructuralmente las partículas víricas del Nilo Occidental presentan una simetría icosahédrica, poseen un diámetro de 50nm con una envoltura lipídica que rodea a la nucleocápside (Chancey *et al.,* 2014). El genoma está formado por una cadena de ARN de polaridad positiva, con un tamaño de 10.6 a 10.9 kb. En el extremo 5´del ARN de los flavivirus existe una región cap, excepto en algunos de los flavivirus transmitidos por garrapatas, la región de ARN más próxima a éste extremo codifica 3 proteínas estructurales. El extremo 3´ del ARN no está poliadenilado, las zonas ARN más

próximas a éste, codifican las proteínas no estructurales (NS). El ácido nucleico vírico tiene un amplio fragmento abierto de lectura (ORF) que codifica unas 10 proteínas, las cuales se forman por un proceso de cotraducción y postraducción, siendo cortadas en el último momento una vez sintetizadas (Vadillo Machota *et al*., 2002).

Entre las proteínas estructurales de los miembros de ésta familia se encuentran: la proteína C, localizada en la nucleocápside (Vadillo Machota *et al*., 2002); se asocia con el genoma de ARN y media el ensamblaje viral (Chancey *et al.,* 2014). La proteína prM, un precursor glicosilado que es cortado durante el proceso de maduración del virión hasta forma la proteína M (situada en la envoltura); y la proteína E, constituye la principal glicoproteína de los peplómeros (Vadillo Machota *et al*., 2002). La proteína E media tanto la unión del receptor en la superficie celular para la entrada viral y fusión con la membrana de la célula hospedadora. Así mismo posee siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B Y NS5) son multifuncionales y juega un papel crítico en la síntesis del ARN viral *(Figura 1)* (Chancey *et al.,* 2014).

Las proteínas NS también pueden modular la señalización celular y la respuesta inmune; en particular, la proteína NS1 VNO antagoniza las defensas antivirales del hospedador a través de la inhibición de la transducción de señales TLR3 y la activación STAT1/STAT2. Se ha demostrado que NS1 inhibe la activación del complemento, contribuyendo a la evasión inmune flaviviral (Chancey *et al.,* 2014).

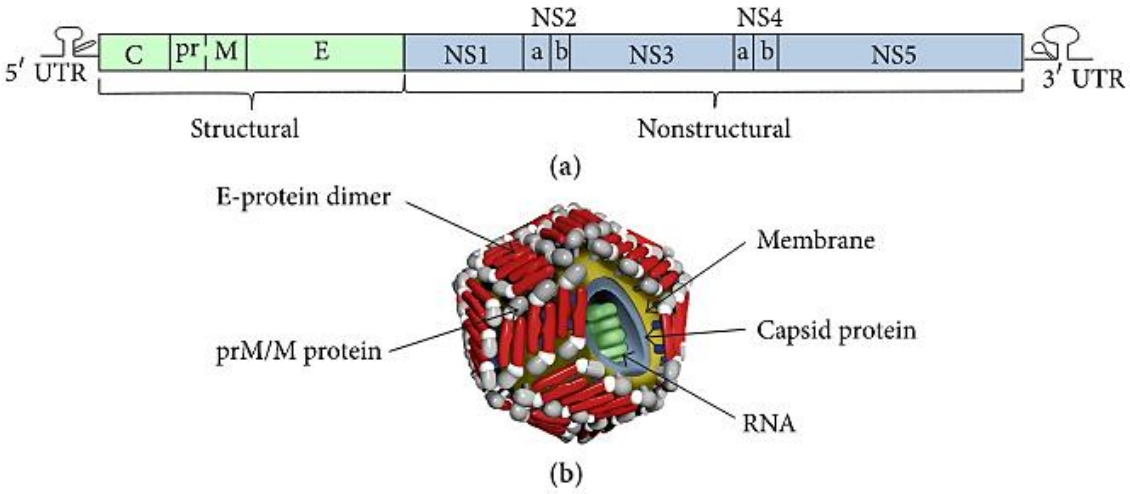


Figura 1. Organización del genoma y composición del virión. (a) el genoma viral se representa con una codificación ORF, 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales. Se indican los UTRs 5' y 3'. Las proteínas estructurales están coloreadas de verde mientras que las proteínas no estructurales son de color celeste. (B) Estructura del virión del Nilo Occidental (Chancey et al., 2014).

2.3.2 Replicación.

Los miembros del género flavivirus se replican en muchos tipos de células, originando en éstas diversos efectos citopáticos. En este sentido, se multiplican en las líneas celulares Vero (de riñón de mono verde africano), BHK-21 (de riñón de hámster recién nacido), cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo y de pato. Igualmente pueden replicarse, pero sin originar efectos citopáticos, en células de mosquito, como la C6/36 (derivadas de *Aedes albopictus*) y las AP/61 (procedentes de *Aedes pseudoscutellaris*). Pueden infectar y provocar la muerte en ratones recién nacidos, de hecho, la mayor parte de los flavivirus se aisló por primera vez a partir de estos animales (Vadillo Machota *et al*., 2002).

En el ataque del virus a las células hospedadoras participan activamente las glicoproteínas E. La partícula vírica penetra en el interior de la célula a través de sus receptores específicos, mediante un proceso de endocitosis. Una vez que el virus se encuentra liberado se replica en el citoplasma celular. A lo largo del proceso de multiplicación vírica, se forman las membranas perinucleares. Una vez producido el ensamblaje de los componentes víricos en las cisternas del retículo endoplásmico, los nuevos virus salen al exterior bien por exocitosis o mediante lisis celular (Vadillo Machota *et al*., 2002).

2.4 Sinonimias.

Enfermedad neuroinvasiva del Nilo Occidental, Enfermedad del Nilo Occidental, Encefalitis equina del Cercano Oriente, Lordige (CFSPH/IICAB, 2010).

2.5 Clasificación genética.

El VNO es un virus genética y geográficamente diverso. Se han propuesto cinco linajes genéticos distintos basado en publicaciones de análisis filogenéticos de asilamientos. Sus genomas difieren entre sí por más de 20-25% y se correlacionan bien con el punto geográfico del aislamiento (Chancey *et al.,* 2014).

El linaje 1 ha causado los brotes más recientes, se puede dividir en tres clados (1a, 1b y 1c); éste contiene virus virulentos y atenuados. Muchos de los virus virulentos encontrados en los brotes recientes pertenecen al clado 1a, que se ha expandido. La cepa que ingresó a Estados Unidos en 1999, denominada NY99, parece estar relacionada con el virus del linaje 1a observado en Israel desde 1997 al 2000, y es una de las más virulentas. Una variante de éste virus, llamada WN02, se ha convertido últimamente la cepa predominante en Estados Unidos y Canadá, y NY99 parece haber desaparecido. En América, se han aislado varias cepas atenuadas del VNO desde el 2003. El clado 1a está distribuido más ampliamente, se producen infecciones en la

región noreste y central de África, Medio Oriente, partes de Europa continental, Australia y las Américas *(Figura 2)*. El clado 1b contiene los virus Kunjin, un subtipo del VNO observado en Australia y el caldo 1c contiene virus observados en la India (CFSPH/IICAB, 2010). Se han detectado aislamientos de virus del linaje 2 que datan históricamente como endémicos en África subsahariana, Madagascar y han causado brotes zoonóticos esporádicos en África del Sur; se ha sugerido que el linaje 2 del VNO se originó en África y se introdujo en Europa, donde se convirtió en endémico, por lo menos en dos de los brotes ocasionados durante las últimas dos décadas (Ciota y Kramer, 2013), generalmente causan infecciones asintomáticas o afecciones leves; también existen especies virulentas en los virus del linaje 2 y en ciertas regiones en las que circulan junto a los virus del linaje 1 (CFSPH/IICAB, 2010).

El linaje 3 del VNO es representado por un par de aislamientos de mosquitos provenientes de República Checa de una región cercana a Rabensburg, Austria en 1997 y 1999, los cuales han demostrado experimentalmente capacidad para infectar solamente mosquitos y células de mosquito. El Linaje 4 comprende los virus que circulan en Rusia desde 1988, incluyendo un aislamiento de garrapata del suroeste del Cáucaso y un número de aislamientos de mosquitos y reptiles en el delta del río Volga en Rusia occidental. El linaje 5 anteriormente fue considerado del clado 1c del linaje 1; se han realizado aislamientos en la India desde 1955 hasta el presente. Se han descrito otros linajes potenciales del WNV, incluyendo virus Koutango de África, un grupo de aislamientos de España, una variante del virus Kunjin aislado de Sarawak, Malasia, y un aislado de Senegal *(Figura A-1)* (Ciota y Kramer, 2013).

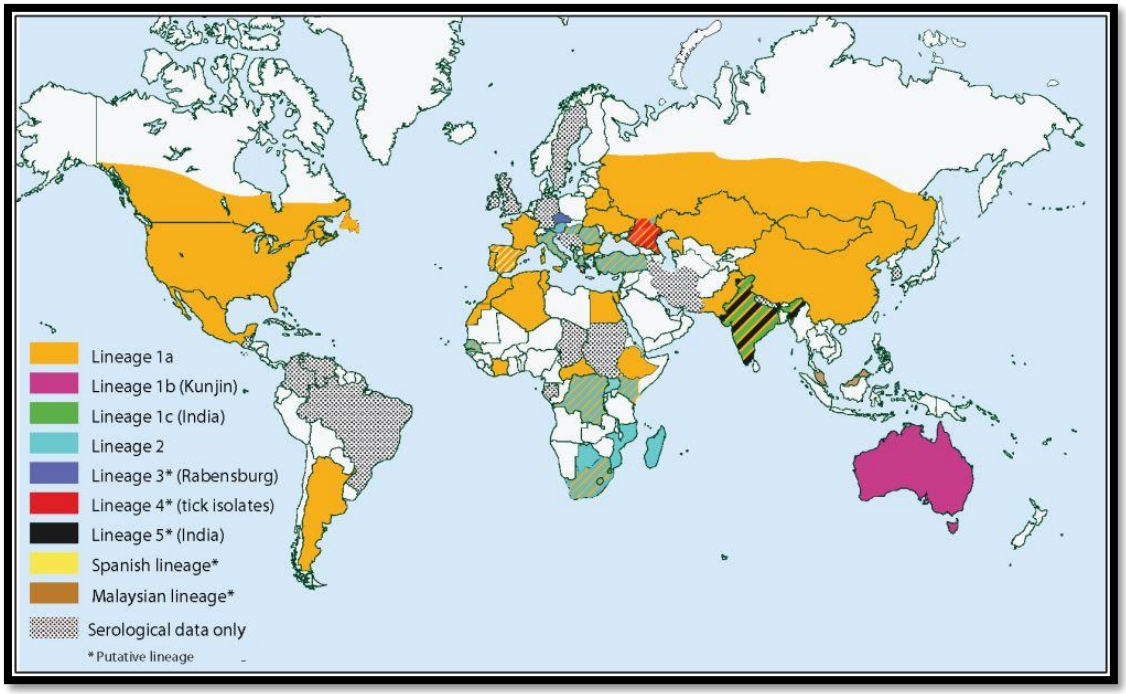


Figura 2. Distribución mundial del virus del Nilo Occidental (Ciota y Kramer, 2013).

2.6 Distribución geográfica.

Los virus del Nilo Occidental se encuentran en gran parte del mundo (África, partes de Asia y Europa, la región del Mediterráneo, Medio Oriente, Australia y América); desde su introducción a Norteamérica en 1999, se ha propagado hacia el norte a Canadá, y hacia el sur a América Central y del Sur y el Caribe. Desde enero del 2009, hay evidencia de la existencia de este virus en lugares tan australes como Colombia, Argentina y Venezuela. Aún no se ha introducido en Hawái, ni en otras islas (CFSPH/IICAB, 2010).

La aparición de la enfermedad en el ser humano y en los animales junto con la vigilancia de la actividad del VNO en aves y en mosquitos ponen de manifiesto que el ámbito de distribución del virus ha aumentado drásticamente, y que incluye América del Norte, Central y del Sur, así como Europa y países de la cuenca del Mediterráneo (OIE, 2013).

2.7 Período de incubación.

El periodo de incubación de la encefalitis equina por el VNO después de la transmisión por el mosquito se estima que es de 3–15 días (OIE, 2013).

2.8 Transmisión.

La encefalitis del Nilo Occidental es mantenida en la naturaleza en un ciclo entre las aves y mosquitos del género *Culex sp.* (OPS *et al*., 2013). Sólo las aves están en condiciones de actuar como reservorio, ya que tienen una viremia de título alto y por

un tiempo prologado; por consiguiente, pueden servir de fuente de infección para el vector artrópodo (OPS, 2003); por tanto, favorece los ciclos de transmisión enzoótica de este patógeno (Petersen y Hayes, 2008).

Las aves son los hospedadores amplificadores primarios y los équidos y los humanos son considerados hospedadores accidentales finales (OPS *et al.*, 2013). En general los títulos séricos del VNO suelen ser insuficientes tanto en el ser humano como en los caballos para infectar a los mosquitos (Petersen y Hayes, 2008).

La transmisión a los hospedadores se produce mediante la picadura de mosquitos infectados. En el ciclo primario, enzoótico, o de amplificación, los mosquitos ornitofílicos como el *Cx. pipiens*, se alimentan de aves virémicas y si se dan las condiciones apropiadas de temperatura, especies de mosquitos, densidad de población de mosquitos, número de hospedadores susceptibles, etc. Se producirá una epizootia en la población aviar. El ciclo secundario envuelve a artrópodos diferentes que transmiten la infección a otros hospederos como équidos y humanos (*Figura 3*) (OPS *et al*., 2013). Además, en las áreas de distribución del virus hay un gran número de aves que se reproducen con un ritmo adecuado, para proveer un número suficiente de crías susceptibles y mantener de esta manera el ciclo de la infección (OPS, 2003).

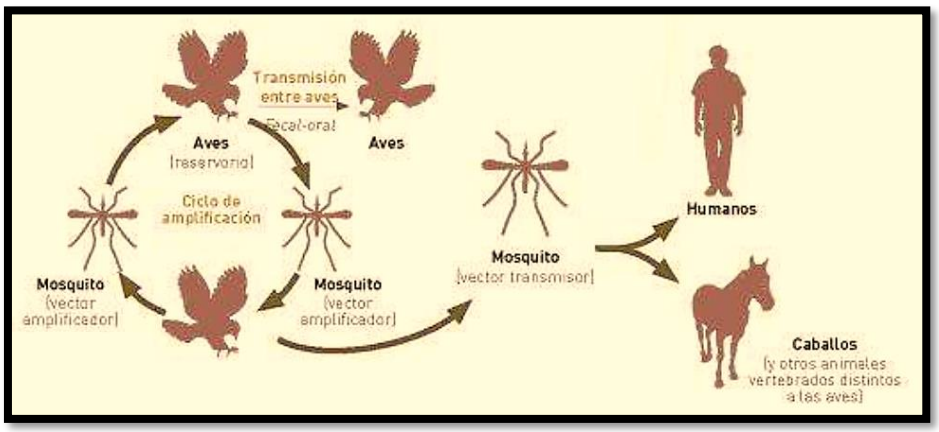


Figura 3. Ciclo de trasmisión VNO (CCAES, 2014).

2.8.1 Vectores mosquitos.

Los vectores pueden ser biológicos que están persistentemente infectados y permiten que el agente patógeno se desarrolle y se reproduzca o vectores mecánicos, en los cuales el agente patógeno reside por un breve periodo de tiempo. Debido que están persistentemente infectados, los vectores biológicos son más proclives a introducir agentes de enfermedades exóticas en áreas nuevas. Los vectores como los mosquitos

actúan como vectores biológicos, transportando el VNO que se está reproduciendo (CFSPH/IICAB, 2010).

La infección con VNO ha sido documentada en una amplia variedad de especies de mosquitos en Europa (Hubálek y Halouzka, 1999). En el hemisferio Occidental, a pesar de haberse documentado que una gran variedad de mosquitos transmite el virus, el género *Culex* parece ser clave y dominante en el mantenimiento de los ciclos locales de trasmisión (García y Londoño, 2007). El CDC (1999) reportó haber encontrado el VNO en 64 especies de EUA, reportando como vectores eficaces al *Culex pipiens, Culex quinquefasciatus, Culex restuans, Culex salinarius y Culex tarsalis*. Otras especies, entre ellas: *Culex nigripalpus, Aedes albopictus, Aedes vexans y Ochlerotatus triseriatus* pueden ser importantes en la transmisión. Los mosquitos que pueden sobrevivir el invierno también pueden albergar el VNO (CFSPH/IICAB 2010). Experimentalmente se ha demostrado que hay trasmisión vertical en mosquitos y el virus se ha aislado en hembras hibernantes, lo que sería un mecanismo de persistencia viral reemergiendo en verano (Hayes citado por Vásquez Aguilar, 2009).

2.8.1.1 Especies de Culícidos identificadas en El Salvador.

Las investigaciones entomológicas realizadas en El Salvador, en el departamento de Usulután, municipio de Berlín permitieron identificar un gran número de larvas y adultos de mosquitos *Culex pipiens quinquefasciatus, Culex pipiens, Culex nigripalpus* y *Aedes aegypti* (índice de casa 20%). *Cx. pipiens quinquefasciatus* se encuentra en altas densidades en las estaciones secas en El Salvador (Cruz, 2003). Actualmente el Ministerio de Salud, lleva a cabo controles entomológicos para mosquitos del género *Aedes* y *Anopheles* por su importancia en la trasmisión de enfermedades epidémicas como dengue, sika y chicunguya[1]

2.8.1.2 Hábitats y alimentación.

Clements, citado por García y Londoño (2007), determinó que *Culex quinquefasciatus* es el mosquito más frecuentemente encontrado en al ambiente humano, tanto urbano como rural. En cuanto a la distribución, estas especies abarcan las zonas tropical y subtropical. Los sitios de crianza adecuados para los juveniles son seleccionados de manera natural por las hembras, las cuales prefieren cuerpos de agua permanentes o temporales, de aguas limpias, eutrofizadas o en algunos casos contaminadas, dulce o salobre, con vegetación o sin ella. Otros se encuentran comúnmente en recipientes

[1] Romero, E. 2016. Control de Vectores (entrevista). San Salvador, SV, Unidad de Vectores Ministerio de Salud El Salvador.

artificiales que contienen agua y, por tanto, hasta cierto punto son sinantrópicos (Ocegueda y Llorente, citado por Cortés Guzmán, 2013).

Harry y Chester, citados por Montecinos (2008) señalan que algunas especies del género *Culex* se alimentan de aves o animales domésticos como el ganado o caballos, mientras que otros prefieren al ser humano. Dado que estas preferencias no son exclusivas, una especie aceptará a otras especies disponibles, lo que explica la transmisión del virus de las aves a los seres humanos. La hembra de mosquito requiere de dos o más días para digerir una comida de sangre, establecer un lote de huevos, y luego buscar otra fuente de sangre. Este ciclo de alimentación, poner huevos, alimentación y de nuevo poner huevos, se puede repetir muchas veces en la vida de una sola hembra. Por lo general sólo un apareamiento de la hembra es necesario para fertilizar la producción de huevos durante toda su vida.

2.8.1.3 Período de vida y distancia de vuelo.

La vida de los mosquitos adultos no es bien conocida. Algunas especies viven al parecer uno o dos meses durante el verano. Los adultos que hibernan pueden vivir durante seis meses o más. Sólo las hembras pican y la mayoría (pero no todas) de las especies requieren una alimentación de sangre antes de que puedan poner los huevos fértiles. Las hembras tienden a viajar grandes distancias y, al parecer, viven más que los machos (Harry y Chester, citados por Montecinos, 1993).

El rango de dispersión de los *Culex quiquefasciatu*s no excede un radio de vuelo de más de 500m, pero excepcionalmente puede alcanzar varios kilómetros. Los mosquitos se encuentran en todo el mundo con excepción de los lugares que son permanentemente fríos, tres cuartos de todas las especies de mosquitos viven en el trópico húmedo y zonas subtropicales como humedales, lagunas y charcos temporales (Clements, citado por García, 2007).

2.8.2 Transmisión no mediada por mosquitos.

Los humanos no eliminan el VNO a través de sus secreciones o excreciones, sin embargo, se ha confirmado la transmisión del virus en humanos por transfusión de sangre, trasplante de órganos y lactancia (OIE, 2013), y de la madre al hijo a través de la placenta (Petersen y Hayes, 2008); pero la mayoría de las infecciones en los humanos se producen por el contagio natural debido a la picadura de los mosquitos (OIE, 2013). Se han encontrado casos en personas que manipulan aves infectadas o tejidos infectados de cocodrilos (CFSPH/IICAB, 2010).

De igual modo se ha descrito la transmisión del VNO por exposición percutánea e inhalación en los laboratorios y exposición de la conjuntiva durante la manipulación de aves muertas (Petersen y Hayes, 2008).

Algunas ardillas arborícolas y terrestres también eliminan VNO en sus secreciones orales, orina y/o heces, y posiblemente presenten la capacidad de transmitir el virus horizontalmente. Los mamíferos carnívoros y los reptiles (por ejemplo, gatos y cocodrilos) también se pueden infectar al ingerir tejidos que contienen el virus (CFSPH/IICAB, 2010). Los conejos pueden presentar títulos suficientemente altos para infectar a los vectores. Se cree que los caimanes podrían actuar como reservorios competentes en el sudeste de los EUA (Petersen y Hayes, 2008).

2.8.3 Otros vectores involucrados en la transmisión del VNO.

Es posible que otros artrópodos desempeñen roles de menor importancia en la transmisión. Se han documentado infecciones en garrapatas de Asia, Europa y el Medio Oriente, y se ha demostrado la transmisión experimental de VNO a través de garrapatas blandas (familia *Argasidae*). Las moscas planas o hipobóscidas podrían transmitir este virus en América del Norte y se han encontrado piojos infectados (*Philopterus sp.)* en cuervos con VNO (CFSPH/IICAB, 2010).

2.9 Hospederos aviares.

Las aves son huéspedes que constituyen el reservorio principal del virus del Nilo Occidental, éstas tienen la capacidad de transportar el virus a nuevas regiones, dándoles el título de amplificadores del virus y producir epidemias de suficiente duración y magnitud para infectar a los mosquitos vectores (CFSPH/IICAB, 2010).

El nivel y duración de la viremia varían según la especie. En algunas especies aviares se produce la transmisión horizontal. La infectividad del virus que se encuentra en las heces aviares disminuye drásticamente después de 24 horas (CFSPH/IICAB, 2010).

2.9.1 Especies afectadas.

Las paseriformes, aves con patas prensiles son importantes para la amplificación del virus. Algunos ejemplares de otros órdenes como Charadriformes (aves playeras), Falconiformes como halcones, águilas, buitres y otras especies afines y Strigiformes, (lechuzas), también pueden trasmitir el virus a los mosquitos. Muchas aves en especial las especies del hemisferio oriental, portan el virus de forma asintomática, otras especies pueden enfermarse. En Norteamérica, las aves silvestres afectadas con mayor frecuencia son los córvidos como cuervos, urracas y arrendajos, el petirrojo americano, *Turdus migratorius*, la curucucha, Sialia sialis, los herrerillos, *poesile sp.* Los carboneros cresta negra, *Bacolophus bicolor*, los pájaros azules del este

Troglodytes aedon. También el virus ha ocasionado la muerte de lechuzas, cernícalos americanos, águilas y buitres. En gansos domésticos se han registrado brotes. Las infecciones en aves gallináceas (orden Galliformes) varían según la especie. Los pollos y pavos se seroconvierten pero permanecen asintomáticos. No obstante, el urogallo de las artemisas *(Centrocercus urophasianus*) es altamente susceptible y se han producido brotes en perdices chukar (*Alectoris chukar*) y faisanes imperiales (*Lophophorus impeyanus*). Se informó sobre un caso en un pavo silvestre (*Meleagris gallopavossp*). Las aves psitácidas son relativamente resistentes a la enfermedad, pero se han observado algunos casos en guacamayos, periquitos, rosellas, loris, loros sol (*Aratinga solstitialis*), pericos australianos (*Melopsittacus undulatus*), cacatúas (*Nymphicus hollandicus*) y diversas especies de loros. También se han visto afectados los emús, pingüinos, palomas, flamencos, pelícanos blancos americanos (*Pelecanus erythrorhyncos*), cormoranes, gaviotas, patos de anteojos (*Anas specularis*), grullas grises (*Grus canadensis*) y otras especies. En general, se han registrado infecciones por virus del Nilo Occidental en casi 300 especies de aves norteamericanas desde 1999 (CFSPH/IICAB, 2010).

Las aves conocidas por eliminar VNO en sus secreciones orales o heces son: el ganso doméstico *(Anser anser domesticus*), córvidos (*Corvus corax*), gaviotas pico anillado (*Larus delawerensis*) y algunas aves rapaces (CFSPH/IICAB, 2010).

2.9.2 Viremias.

En promedio son de mayor magnitud y duración en aves de los órdenes Passeriformes y Charadriiformes, mientras que los grupos donde se han visto la menor titulación y duración de viremia son las Psitácidas y en las Gallináceas. Las aves pueden actuar como reservorios del VNO por largos periodos de tiempo. Las aves que sobreviven a la infección mantienen una viremia detectable por solo 1 a 7 días, después de lo cual la infección es eliminada de la sangre por el sistema inmune del hospedero. Aunque el ARN viral persiste en determinados órganos por largo tiempo (más de 4 meses) (Cortés, 2013).

Familias de aves que forman parte del ciclo de transmisión en Norteamérica:

- Índices de competencia mayores en *Corvidae, Icteridae, Fringillidae y Passeridae.*
- Competencia moderada en *Laridae, Turdidae, Charadriidae, Strigidae, y Falconidae.*
- Competencia baja en *Anatidae, Columbidae, Picidae, Rallidae, Phasianidae, y Psittacidae* (Komar, 2003).

2.9.3 Patogénesis aviar.

Múltiples órganos viscerales son afectados al igual que el cerebro y la muerte se atribuye a miocarditis y encefalitis. La enfermedad en aves se caracteriza por fiebre y síntomas no específicos. El virus está presente en sangre durante la fase aguda y el mecanismo de invasión subyacente del sistema nervioso central es probablemente similar a otro flavivirus. Las observaciones patológicas de individuos con encefalitis fatal evidencian inflamación difusa caracterizada por células mononucleares parenquimales difusas y nódulos microgliales, manguitos perivasculares y degeneración neural. El tallo cerebral es el más afectado. El virus se ha aislado del bazo, nódulos linfoides, hígado y pulmones (Soler y Veras, 2009).

2.9.4 Signos clínicos en aves.

En muchas especies de aves, la infección por el VNO no produce síntomas evidentes, mientras que, en otras como el cuervo americano *(Corvus brachirhynchos)* y el arrendajo azul *(Cyanocitta cristata),* la enfermedad a menudo es generalizada y mortal. En américa del Norte, algunas especies de aves tiene infecciones subclínicas, pero otras se enferman. Se han notificado diversos síntomas en aves en cautiverio, en criaderos y experimentales. Los signos son inespecíficos e incluyen, pérdida de peso, disminución de la actividad, depresión, diarrea, anorexia, debilidad, letargo, plumas erizadas, descargas nasales y orales acuosas, trasparentes o profusa también se registran signos neurológicos como tortícolis, movimientos circulares, convulsiones, opistótonos, movimientos rítmicos laterales de la cabeza, ataxia, paresia, convulsiones, incoordinación, parálisis, temblores, nistagmo, alteraciones visuales, entre otros; estos signos pueden ser progresivos y llevar a la muerte; se han registrado aves con signos neurológicos progresivos en tres semanas lo que ha llevado al sacrificio de las mismas. Se ha notificado durante necropsias miocarditis y lesiones de encefalitis. Muchas aves silvestres se han encontrado muertas sin signos clínicos aparentes (CFSPH/IICAB 2010).

2.10 Infecciones en equinos y hospederos no aviares.

Entre los mamíferos, la enfermedad aparece en équidos (caballos, asnos y mulas). Los casos clínicos parecen ser infrecuentes en las otras especies de mamíferos, pero pueden ser frecuentes las infecciones asintomáticas (CFSPH/IICAB, 2010).

Se han registrado casos clínicos también en alpacas, ovejas y renos (*Rangifer tarandus*), así como en ardillas silvestres, focas comunes (*Phoca vitulina*), rinocerontes indios (*Rhinoceros unicornis*) y en un lobo, un macaco de Berbería (*Macaca sylvanus*)

y un ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*). Los perros y gatos parecen infectarse fácilmente, pero rara vez se enferman (CFSPH/IICAB, 2010).

Se han hallado anticuerpos de VNO en muchas especies, incluso en ganado bovino, cabras, cerdos, ciervos, lémures, murciélagos, zorrillos, osos, zorros, mapaches, zarigüeyas, conejos, primates, pequeños roedores e insectívoros. También se ha informado la existencia de anticuerpos en muchas especies de mamíferos silvestres (CFSPH/IICAB, 2010).

Se han confirmado infecciones experimentales en diversos mamíferos: ratones, hámsters, gatos y monos rhesus que desarrollan signos clínicos leves, pero los conejos, cerdos, cobayos, perros y erizos comunes (*Erinaceus europaeus*) permanecen asintomáticos. Entre los reptiles, se han registrado brotes sólo en cocodrilos, pero murieron algunas culebras infectadas experimentalmente (*Thamnophis sirtalis*) y se hallaron anticuerpos en tortugas. Se reportaron infecciones experimentales en iguanas verdes (*Iguana iguana*). Algunos anfibios, entre ellos la rana verde común (*Rana ridibunda*) y la rana toro americana ((*Rana catesbeiana*), pueden infectarse con VNO. Algunas especies de mamíferos, reptiles y anfibios, incluso ardillas arborícolas (*Sciurus* sp.), ardillas listadas (*Tamias striatus*), conejos de matorrales (*Sylvilagus floridanus*), al gátor americano (*Alligator mississippiensis*) y ranas verdes comunes (*Rana ridibunda*) pueden transmitir VNO a los mosquitos, aunque su importancia como reservorios es todavía incierta (CFSPH/IICAB, 2010).

2.10.1 Patogenia en equinos.

El VNO es neurotrópico. Los caballos suelen tener una viremia de baja titulación, con lesiones solamente en el SNC (McVey *et. al.,* 2015).

La apoptosis es un importante mecanismo de muerte celular asociada con la infección por VNO en el SNC. El grado de la apoptosis neuronal y la encefalitis en el tejido infectado se ve influenciada por la intensidad de la respuesta inflamatoria inicial. Por consiguiente una respuesta inflamatoria más agresiva puede potenciar la muerte celular. Una respuesta inmune retrasada o suprimida puede permitir un desarrollo y propagación más extensos de la infección, conduciendo a una patología más severa en el SNC, como se observa en los caballos viejos (McVey *et. al*., 2015).

Estudios recientes sobre neuropatogénesis en ratones, han demostrado que cepas filogenéticamente distintas inducen lesiones parcialmente diferentes en el cerebro, lo que sugiere que la virulencia de las cepas del VNO también se asocian con su tropismo tisular (McVey *et. al.,* 2015).

2.10.2 Manifestaciones clínicas en équidos.

Una rápida viremia de baja titulación precede la aparición de los signos clínicos (OIE, 2013). La mayoría de los caballos se infectan de forma asintomática (CFSPH/IICAB, 2010). Todos los equinos parecen ser igualmente susceptibles a la encefalomielitis del VNO. Los caballos de todas las edades entre 4 a > 30 años pueden ser afectados (Montecinos, 2008). En el primer brote en América la infección por el VNO causada en equinos no tuvo relación con la edad y casta de los caballos (Rey y Rutledge, 2001).

La enfermedad en los caballos se caracteriza frecuentemente por ataxia de intensidad leve a grave, debilidad, fasciculación muscular y problemas en los nervios craneales. La fiebre no siempre está presente (OIE, 2013).

En casos clínicos la enfermedad se caracteriza por anorexia, depresión y signos neurológicos, que pueden incluir ataxia, debilidad o parálisis en una o más extremidades, rechinar de dientes, deambulación sin rumbo, convulsiones y/o marcha en círculos. Los temblores de los músculos faciales y del cuello son muy frecuentes. Algunos animales presentan déficit en los nervios craneales, con debilidad o parálisis facial y lingual, lo que puede conducir a dificultades en la deglución. También son frecuentes los cambios en el comportamiento, somnolencia, aprehensión, hiperestesia o periodos de híper excitabilidad. Algunos caballos con depresión grave y parálisis facial pueden perder la capacidad de sostener la cabeza, lo que ocasiona un edema facial severo. Es posible observar coma, alteraciones de la visión y presión de la cabeza contra objetos, pero esto es menos común que en los casos de encefalitis ocasionadas por Alphavirus. También se han registrado cólicos y disfunciones urinarias (desde leve esfuerzo hasta estranguria). Las lesiones, infecciones adquiridas durante el reposo prolongado, y otros efectos secundarios pueden complicar el curso de la enfermedad (CFSPH/IICAB, 2010).

2.10.3 Lesiones post mortem.

Las lesiones macroscópicas no son frecuentes en caballos. Si ocurren, en general se limitan a pequeñas áreas multifocales de decoloración y hemorragia en la medula espinal, tronco cerebral y mesencéfalo. En los casos agudos pueden estar congestionadas las meninges y también se pueden presentar hemorragias. Son infrecuentes las lesiones tisulares macroscópicas, salvo las del SNC (CFSPH/IICAB, 2010).

Las lesiones histopatológicas se caracterizan por polimeningoencefalitis linfocítica o histiocítica con presencia de manguitos perivasculares de células mononucleares, degeneración neuronal, neuronofagia y gliosis focal. Estas lesiones se manifiestan

principalmente en el tallo cerebral inferior y en la medula espinal, y también pueden aparecer en el cerebro medio. Son menos frecuentes en la corteza cerebral y cerebelosa. En algunos caballos se ha observado miocarditis no supurativa leve, hemorragias dispersas en la medula renal y depleción linfoide del bazo (CFSPH/IICAB, 2010).

2.11 Tratamiento.

Los caballos que se recuperan, en general comienzan a mostrar signos de mejoría dentro de los siete días de la aparición de los primeros signos clínicos; la mayoría, aunque no todos, recuperan sus funciones normales; aproximadamente el 10-20% pueden presentar efectos residuales, como debilidad en una o más extremidades, disminución en la tolerancia al ejercicio, atrofia muscular o alteraciones del comportamiento (McVey *et. al.,* 2015).

Actualmente no existe disponibilidad de una vacuna humana, ni ningún tratamiento antiviral específico para infecciones de virus del Nilo Occidental (McVey *et. al.,* 2015).

2.12 Inmunidad y reemergencia.

La respuesta de anticuerpos a la infección natural por el VNO, se asocia con la recuperación y protección a largo plazo. La respuesta por inmunidad celular es en gran parte dirigida a las proteínas no estructurales del virus. Los linfocitos T citotóxicos y reguladores son importantes para la eliminación del virus (McVey *et. al.*, 2015).

Después que los animales se recuperan de la infección, la inmunidad es de por vida. Esta inmunidad efectiva de por vida se relaciona con grandes reservas de células T de memoria residentes en el CNS y los órganos linfoides secundarios. Los flavivirus han desarrollado múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune innata en el hospedador, como el patrón de reconocimiento de señalización y la respuesta del interferón tipo I. Estas respuestas inmunitarias innatas son componentes vitales de la capacidad inmediata del hospedador para limitar el establecimiento o propagación de la infección. En general, estas respuestas incluyen mecanismos intracelulares para limitar la multiplicación del virus y para dar señal a la activación de una matriz de células de defensa innata, tales como macrófagos residentes (McVey *et. al.*, 2015).

En EUA después de 2003, el número de casos en equinos disminuyó significativamente, probablemente se asocia a la inmunidad conferida por exposición natural o vacunación. Sin embargo, la enfermedad ha resurgido periódicamente (en 2005- 2007 y 2012) (CDC citado por McVey *et. al.*, 2015).

No se dispone de vacunas para uso humano (OIE, 3013).

2.13 Mortalidad.

Aunque la tasa de ataque se ha estimado que está por debajo del 10%, las tasas de mortalidad pueden acercarse al 50% en los caballos que presentan la enfermedad clínica (McVey *et. al*, 2015). El índice de letalidad informada en caballos varía del 23% al 57% dependiendo del brote (CFSPH/IICAB, 2010).

Algunos animales mueren espontáneamente, pero muchos de ellos, que tienen afecciones graves, son sacrificados por razones humanitarias (CFSPH/IICAB, 2010).

El índice de letalidad parece ser alto en mamíferos que desarrollan enfermedades neurológicas. La mayoría de ovejas, alpacas, renos, perros, gatos, lobos y ciervos infectados clínicamente han muerto (CFSPH/IICAB, 2010).

2.14 Vacunación en equinos.

La incidencia de la enfermedad equina por el VNO en EE. UU. Parece haber registrado un notable descenso a raíz de la introducción de una vacuna frente a la infección por el VNO en el caballo (Petersen y Hayes, 2008).

2.15 Importancia del VNO en salud pública.

Los datos obtenidos en estudios serológicos realizados tanto en Norteamérica como en Europa y del cribado de donantes de sangre en EE. UU. Indican que alrededor del 70–80% de las infecciones por el VNO son asintomáticas, entre el 20–30% da lugar a FNO, y una proporción inferior al 1% produce enfermedad neuroinvasiva del Nilo Occidental (ENO) (Petersen y Hayes, 2008).

La enfermedad grave puede ocurrir en personas de cualquier edad. Sin embargo, las personas mayores de 60 años corren el mayor riesgo de enfermarse gravemente. Las cifras publicadas de incidencia de encefalitis del Nilo son más altas en el hombre que en la mujer. Las personas con ciertas afecciones, como cáncer, diabetes, hipertensión, enfermedad renal y las personas que han recibido trasplantes de órganos, también corren mayor riesgo de enfermarse gravemente (CDC, 2015).

Entre los síntomas y los signos de la FNO figuran la fiebre, cefalea, malestar, fatiga, debilidad, mialgias, dificultad para concentrarse, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y exantema. La ENO cursa con encefalitis, meningitis o parálisis flácida aguda tanto de forma individual como combinada, y puede acompañarse de temblor, mioclonia y rasgos parkinsonianos, como rigidez, inestabilidad postural y bradicinesia (Petersen y Hayes, 2008).

Los sujetos afectados por meningitis por el VNO presentan habitualmente rigidez nucal, fotofobia y pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo (Petersen y Hayes, 2008). La ENO se manifiesta con alteración del estado mental o letargo, que pueden acompañarse de signos neurológicos focales o trastornos del movimiento A menudo, la parálisis producida por la infección por el VNO debuta de manera repentina y es asimétrica en una o más extremidades; en algunos casos no se acompaña de fiebre ni de otros síntomas típicos de la enfermedad por el VNO. La coriorretinitis es una complicación frecuente en los pacientes infectados por este virus, en especial en los diabéticos. Otras manifestaciones infrecuentes de la infección por el VNO son la hepatitis, la pancreatitis, la miocarditis, la rabdomiólisis, la orquitis, la diabetes insípida, el síndrome de la persona rígida y la fiebre hemorrágica (Petersen y Hayes, 2008).

Normalmente, los pacientes afectados por la FNO se recuperan sin secuelas graves, aunque muchos de ellos refieren fatiga, debilidad y dolor durante varias semanas a meses. La FNO rara vez tiene consecuencias mortales, aunque puede obligar a hospitalizar al paciente y de manera muy infrecuente se ha vinculado con arritmias e insuficiencia respiratoria. Los pacientes con meningitis asociada al VNO suelen requerir ingreso hospitalario, aunque comporta un pronóstico semejante al de la FNO. No suele dar lugar a secuelas graves, aunque son frecuentes la fatiga, la debilidad, la dificultad de concentración y los problemas de memoria persistentes durante varios meses después de la resolución del cuadro agudo (Petersen y Hayes, 2008).

A menudo, los supervivientes de la ENO presentan secuelas neurológicas permanentes, como parkinsonismo, temblores y ataxia, aunque algunos de ellos disfrutan de una recuperación completa. La mayoría de los sujetos que logra recuperarse de una parálisis por el VNO presentará una debilidad persistente, aunque pueden recuperar la potencia muscular a lo largo de los 8meses siguientes al debut de la parálisis y se ha descrito la recuperación completa incluso en individuos con tetraparesia (Petersen y Hayes, 2008).

2.15.1 Mortalidad y letalidad en humanos.

La parálisis producida por el VNO puede originar una insuficiencia respiratoria neuromuscular que se asocia a una tasa de mortalidad por encima del 50%. (Petersen y Hayes, 2008).

El índice de letalidad de la ENO abarca del 12–20% y se incrementa al aumentar la edad del paciente (Petersen y Hayes, 2008).

2.15.2 Tratamiento en humanos.

No se dispone de ningún tratamiento de eficacia demostrada frente a la enfermedad por el VNO. La fisioterapia o la ergoterapia pueden ser beneficiosas en los pacientes afectados por una debilidad muy intensa tras la parálisis por el virus (Petersen y Hayes, 2008).

2.16 Pruebas diagnósticas.

Debido a la presencia de infecciones latentes por el VNO, los criterios de diagnóstico deben incluir una combinación de evaluación clínica y pruebas de laboratorio (OIE, 2013).

2.16.1 Identificación del agente.

2.16.1.1 Cultivo in vitro e in vivo.

Muestras. Las muestras para el aislamiento del virus incluyen el encéfalo (en concreto el romboencéfalo y el bulbo raquídeo) y la médula espinal de caballos encefalíticos que hayan muerto; varios tejidos de las aves, como el corazón, el encéfalo o el hígado pueden usarse con garantía de éxito. El VNO también puede aislarse de mosquitos. En general, las cepas víricas se obtienen con mayor facilidad a partir de ejemplares de aves y en menor medida de mosquitos y caballos. Los intentos de detección del virus en caballos vivos con signos clínicos no suelen funcionar debido a que se establece una viremia de baja titulación que dura muy poco tiempo (OIE, 2013).

Los virus pueden propagarse en cultivos celulares susceptibles, tales como riñón de conejo (RK-13) y células de riñón de mono verde africano (Vero) o células de riñón de cerdo. El aislamiento primario en huevos de pollo embrionados o líneas celulares de Aedes albopictus (C6/36) seguido de pases por células de mamífero también es una opción. Puede necesitarse más de un pase en cultivos celulares para observar el efecto citopático (EC). La confirmación del aislamiento de cepas de VNO se logra mediante tinción indirecta con anticuerpos fluorescentes de cultivos infectados o mediante métodos de detección del ácido nucleico (OIE, 2013).

2.16.1.2 Métodos moleculares — detección del ácido nucleico.

Muestras. Las muestras adecuadas para la RT-PCR para la detección del VNO son el encéfalo en el caso de los mamíferos, y el encéfalo, el riñón, el corazón, el hígado, el intestino y una muestra combinada de insectos en el caso de las aves (OIE, 2013).

Se han descrito varios métodos de PCR para la identificación del VNO y algunas se comercializan en forma de kit. OIE, 2013 recomienda la RT-PCR en tiempo real que permite detectar VNO tanto de estirpe 1 como de estirpe 2. Además, la RT-PCR

convencional basada en gel y diseñada para detectar cepas de la estirpe 1 de América del Norte; ambas pruebas se han utilizado con éxito con muestras obtenidas sobre el terreno.

Aunque los procedimientos de laboratorio para evitar la contaminación en un método anidado son exigentes, existe mayor sensibilidad para la detección de ARN de cepas del VNO de América del Norte con el procedimiento anidado convencional, en concreto con muestras de caballos obtenidas sobre el terreno. La eficiencia de la RT-PCR convencional para detectar otras estirpes de VNO no se conoce (OIE, 2013).

En vistas de la evolución continua y el posible surgimiento de nuevas cepas del VNO, es importante realizar un seguimiento continuo de las nuevas PCR, y que se actualicen siempre que sea necesario (OIE, 2013).

2.16.1.3 Detección del antígeno – técnicas de inmunomarcaje.

Muestras. El encéfalo, el corazón, bazo, hígado, intestino y pulmón suelen dar positivos en la inmunohistoquímica (IHC) cuando las aves están infectadas. El porcentaje de éxito de la detección mediante IHC en aves positivas mejora con el examen de múltiples tejidos. Los tejidos de encéfalo y médula espinal de caballos con encefalitis vírica causada por VNO no siempre son positivos en la IHC; muchos casos de encefalitis equina dan falsos negativos (OIE, 2013).

La tinción mediante IHC de tejidos de aves fijados en formalina es un método fiable de identificación de infección por el VNO en las aves. La especificidad de la identificación (por ejemplo, sólo de flavivirus o sólo de VNO) depende de la elección del anticuerpo detector (OIE, 2013).

El no identificar el antígeno del VNO en el sistema nervioso central equino no descarta la infección (OIE, 2013).

2.16.2 Pruebas serológicas.

Se pueden identificar los anticuerpos en el suero equino mediante el enzimoinmunoanálisis ELISA con IgM o IgG, inhibición de la hemoaglutinación (IH), neutralización por reducción de placas (NRP) y neutralización vírica por microtítulo (NV). Entre los métodos mencionados, la prueba de NRP es las más específica de las pruebas serológicas de VNO; además permite determinar en paralelo títulos séricos de anticuerpos contra flavivirus relacionados (OIE, 2013); sin embargo, la prueba de neutralización del virus es compleja, requiere experticia en la técnica y no es adecuada para las pruebas a gran escala en los sistemas de vigilancia. Este método también requiere de virus vivos para las muestras de prueba, lo que implica riesgos asociados

con la manipulación de patógenos zoonóticos peligrosos (Sotelo *et al*., 2011). Las manipulaciones de laboratorio deben llevarse a cabo a un nivel adecuado de bioseguridad y contención (BSL) determinado por el análisis del riesgo biológico (OIE, 2013).

De las pruebas serológicas anteriores ELISA es el formato utilizado más ampliamente, ya que es versátil, reproducible, y fácil de estandarizar para la detección de anticuerpos contra el virus en suero. Debido a la importancia clínica de esta enfermedad para los seres humanos y caballos, se han desarrollado diferentes métodos ELISA para la detección de anticuerpos específicos para el VNO que están disponibles comercialmente (Sotelo *et al*., 2011)

El ELISA de captura con IgM es particularmente útil para detectar los anticuerpos equinos resultantes de la exposición natural a VNO. Generalmente, los anticuerpos IgM específicos de VNO equino son detectables desde los 7-10 días hasta 1–2 meses después de la infección. La mayoría de los caballos con encefalitis causada por el VNO dan positivo a la prueba de ELISA de captura con IgM en el momento en que se observan los primeros signos clínicos. Los anticuerpos neutralizantes de VNO son detectables en el suero equino 2 semanas después de la infección y pueden persistir durante más de 1 año (OIE, 2013).

En algunas pruebas serológicas, se pueden encontrar reacciones cruzadas entre los anticuerpos con flavivirus relacionados, como el virus de la encefalitis de St. Louis o el virus de la encefalitis japonesa (OIE, 2013). Esto es de particular importancia en aquellas áreas donde existe una co-circulación de varios flavivirus (Kuno, citado por Sotelo *et al*., 2011).

Finalmente, a la hora de interpretar los resultados serológicos se debe tener en cuenta el historial de vacunación contra el VNO, particularmente en las pruebas de NRP y ELISA con IgG. Puede utilizarse un ELISA de captura con IgM en especies de aves u otras especies siempre que se disponga de anticuerpos de captura específicos de la especie (por ejemplo, anti IgM de pollo) (OIE, 2013).

2.17 Diagnóstico diferencial.

Los síntomas clínicos de la infección por VNO en los caballos derivan de la encefalitis inducida por virus o encefalomielitis (OIE, 2013) *(Cuadro A-1 y A-2).*

2.18 Migración de aves y diseminación del VNO.

Existen evidencias de que el origen de la introducción de este virus al Hemisferio Occidental haya sido su dispersión intercontinental a través de aves migratorias. La

diseminación de esta infección en el Continente Americano está siguiendo claramente la de los patrones migratorios de diversas aves, que pueden alcanzar cualquier parte del Suroeste de Estados Unidos, México, América Central, Islas del Caribe y Sudamérica (Barriga *et al.,* 2002). Reed citado por Vásquez Aguilar (2003) estima que cada año, cinco mil millones de aves representadas de 3000 especies migran de Norteamérica (Canadá y Estados Unidos) a México, Centro América y América del Sur, y un número similar viaja del este de Europa a África.

Una porción importante de aves playeras y marina migratorias son habitantes frecuentes de una gran variedad de humedales que se destacan por presentar una alta oferta de recursos tróficos, razón por la cual son utilizados intensamente por las aves migratorias como sitios de reabastecimiento durante sus maratónicos vuelos. Por esta misma razón, también son muy valorados por el hombre, quien encuentra en ellos números beneficios directos como pesca, marisquería, suministros de agua, riego y energía, sitios de recreación y esparcimiento, etc. Otros beneficios generalmente poco percibido y valorado por la sociedad son las funciones que cumplen en el ciclo del agua, reciclado de nutrientes, regulación de contaminante y como reservorios de diversidad biológica. La migración aviar se define como el movimiento periódico de individuos entre un sitio (área de reproducción) y otro (área de invernada o descanso). Se ha desarrollado como un mecanismo biológico que permite adaptarse y sobrevivir a las variaciones climáticas y ambientales que se producen durante la estación de año. (Petracci *et al.,* 2005).

Las aves migratorias se desplazan entre las áreas de reproducción e invernada utilizando rutas o corredores migratorios, que siguen fielmente año tras año. A grandes rasgos se definen tres orientados en sentido norte-sur la ruta del Pacifico, Central y Atlántica *(Figura A-2).* Según la especie, durante los vuelos de ida y vuelta pueden utilizar una misma ruta o combinar diferentes. Unos pocos humedales, ubicados estratégicamente a lo largo de estos recorridos pueden soportar las grandes concentraciones de individuos que forman durante la migración y ofrecen alimento suficiente para completar la siguiente etapa. Allí se alimentarán intensamente para acumular debajo de la piel reservas grasas- la manera más efectiva de almacenar energía- que serán utilizados como combustible durante el vuelo. Algunos de estos humedales distan miles de kilómetros unos de otros, separados por barreras ecológicas y geográficas donde no existen las condiciones adecuadas para reposar y alimentarse (Petracci *et al.,* 2005).

2.18.1 Aves de El Salvador: estado actual de conocimiento.

A partir de la década de 1980 se comenzaron a desarrollar iniciativas conjuntas entre ornitólogos extranjeros y ornitólogos nacionales quienes han contribuido sustancialmente a incrementar el acervo del conocimiento sobre las distintas especies de aves que ocurren en nuestro país (Ibarra 2013).

Los ornitólogos Komar y Domínguez, citados por Ibarra (2013) realizaron una revisión de las especies de aves registradas en El Salvador y elaboraron un listado de 522 especies más 3 subespecies. Desde ese esfuerzo a la fecha, se han descubierto 40 nuevas especies para El Salvador, con lo que el listado asciende a 563 especies. Del total de especies, 60 se hallan amenazadas y 120 en peligro.

2.18.2 Estado de las especies de aves registradas en El Salvador.

La mayoría de las especies en el listado actualizado son residentes (48%), y migratorias (23%), el resto está ubicado en otras categorías que no sobrepasan el 10% del total *(Figura A-3)* (Ibarra, 2013).

2.19 Humedales RAMSAR de El Salvador.

De acuerdo a la convención internacional para la conservación y uso racional de humedales (RAMSAR), los humedales se definen como las extensiones de marismas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de aguas, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros. Podrán comprender sus zonas ribereñas o costeras adyacentes, así como las islas o extensiones de agua marina de una profundidad superior a los seis metros en marea baja, cuando se encuentren dentro del humedal (MARN, 2013).

La convención Ramsar, fue creada en 1971 en la ciudad de Ramsar, Irán, en donde científicos de todas partes del mundo, acordaron proteger los humedales por su importancia como hábitat para una gran cantidad de especies de aves migratorias a nivel global. Esta convención se enfoca en procurar el uso racional de estos ecosistemas en beneficio de la humanidad; es un tratado intergubernamental que sirve de marco para la acción nacional y la cooperación internacional en pro de la conservación y el uso racional de los humedales y sus recursos (MARN 2013).

Diferentes países se han suscrito a este acuerdo internacional. El Salvador se incorporó a esta convención en el año de 1999. A partir de ese año, se han designado seis sitios Ramsar: Área Natural Protegida laguna el Jocotal, Complejo Bahía de Jiquilisco, Embalse Cerrón Grande, laguna de Olomega, Complejo Güija, Complejo

Jaltepeque. Además, existen otros humedales que completan un total aproximado de 130 a nivel nacional (MARN, 2013) *(Figura A-4).*

2.19.1 Laguna el jocotal.

Este humedal sustenta de manera regular una población que supera las 20,000 aves acuáticas, entre ellas migratorias y residentes, que encuentran en la laguna hábitat, refugio y alimento. Existe un listado de aves identificadas en el humedal, de las cuales se ha retomado su grado de competencia en la transmisión del VNO por poseer títulos altos y moderados de viremia, según la familia a la cual pertenecen *(Cuadro A-3).*

2.20 Vigilancia epidemiológica del VNO.

La vigilancia del VNO se compone de dos actividades distintas, pero complementarias. Las medidas de vigilancia epidemiológica por enfermedad del Nilo Occidental humana, para cuantificar e identificar la carga estacional, geográfica, y los patrones demográficos de la morbilidad y la mortalidad en humanos, y vigilancia ambiental que monitorea la actividad local del virus del Nilo Occidental en vectores y hospedadores vertebrados no humanos de antelación a la actividad epidémica que afecte a poblaciones humanas (CDC, 2013).

En Norteamérica la vigilancia epidemiológica del VNO además de dar seguimiento a la carga y distribución de la enfermedad, ha sido instrumento en la caracterización de la presentación de enfermedad clínica y su desenlace, así como en la identificación de poblaciones de alto riesgo y los factores asociados con la enfermedad grave del VNO. La vigilancia epidemiológica y ambiental para el WNV fue facilitada por el desarrollo y la implementación de ArboNET, el sistema nacional de vigilancia de arbovirus; ArboNET fue desarrollado en 2000 como una plataforma de vigilancia completa en la captura de datos para supervisar infecciones por el VNO en humanos, mosquitos, aves, otros animales, y cómo el virus se propagó y se estableció en el país. Este enfoque integral fue esencial para dar seguimiento a la actividad de expansión del VNO y sigue siendo una fuente importante de datos, contribuyendo a la comprensión de la epidemiología y ecología del virus (CDC, 2013).

El principal objetivo de la vigilancia ambiental del VNO es cuantificar la intensidad de la transmisión del virus en una región con el fin de proporcionar un índice predictivo de riesgo de infección humana. Ésta predicción del riesgo, junto con información sobre las condiciones locales y hábitats donde se reproducen mosquitos vectores del VNO, puede ser utilizado para generar un programa de manejo integrado de vectores y las decisiones correspondientes sobre la prevención y control (CDC, 2013).

2.20.1 Estrategias de vigilancia de las encefalitis equinas.

(OPS *et al.,* 2013) proponen estrategias de vigilancia estructuradas en la base de la búsqueda de respuestas a los desafíos que la epidemiología de las encefalitis equinas (EE) plantea para la vigilancia y el control; se identifican dos componentes principales en la estrategia de vigilancia de encefalitis equinas (EE): i) acciones de detección de casos en humanos y équidos, ii) acciones dirigidas a caracterizar y monitorear al riesgo.

Estos componentes y las acciones en ellos definidas se complementan, de manera que los esfuerzos para mejorar la sensibilidad y estudio de casos humanos y équidos constituyen un elemento esencial en la caracterización y el monitoreo del riesgo y a su vez, los hallazgos ayudan a comprender mejor la dispersión espacial y el comportamiento en los focos, mediante estudios epidemiológicos, entomológicos y de reservorios, a fin de orientar las acciones más oportunas para la detección y control de casos (OPS *et al.,* 2013).

A continuación, se presentan las acciones de vigilancia que componen ésta estrategia, pero debe entenderse que las limitaciones operacionales en los sectores salud y agricultura, plantean la necesidad de priorizar acciones en cada estrategia nacional entre la gamma de intervenciones expuestas.

Cuadro 1. Componentes de la estrategia de la vigilancia de las EE.

Componente	Acción	Ámbito
Detección temprana de casos en humanos	Detección rutinaria de casos probables de EE.	Universal en el país.
Detección temprana de casos en équidos.	Vigilancia intensificada del síndrome febril/ enfoque sindrómico para la atención de casos febriles y neurológicos.	Universal en las zonas de riesgo.
	Vigilancia centinela con enfoque sindrómico (febril) en humanos.	Zonas seleccionadas.
	Detección del síndrome neurológico equino*.	Universal en el país.
Caracterización y monitoreo del riesgo.	Estudios poblacionales de seroprevalencia en humanos*.	Zonas seleccionadas.
	Estudios en bancos de sueros y bancos de sangre de humanos y/o animales.	Zonas seleccionadas.
	Estudios de circulación viral en animales domésticos.	Zonas seleccionadas.
	Estudios entomológicos*.	Zonas de riesgo de

		transmisión enzoótica.
	Detección de mortalidad de aves silvestres*.	En zonas seleccionadas según rutas y estuarios.
	Circulación viral en reservorios silvestres y centinelas*.	En zonas seleccionadas según rutas y estuarios.
	Caracterización ecológica y ambiental.	Zonas seleccionadas.

∗ Principales acciones de vigilancia del VNO a considerar en la implementación de planes nacionales. Fuente: (OPS *et al*., 2013) *(Cuadros A-4, A-5, A-6, A-7, A-8).*

Según el Código Sanitario para los Animales Terrestres (OIE, 2016) la presencia de la fiebre del Nilo Occidental se define en función de los siguientes criterios:

1) El aislamiento del virus del Nilo Occidental en un *animal* que presenta signos clínicos que corresponden a la fiebre del Nilo Occidental, o
2) la detección de antígeno o de ácido ribonucleico específicos del virus del Nilo Occidental en muestras procedentes de uno o varios *animales* que manifiesten signos clínicos compatibles con la fiebre del Nilo Occidental o que estén epidemiológicamente relacionados con un *brote* confirmado o presunto de fiebre del Nilo Occidental, o
3) la detección de anticuerpos contra el virus del Nilo Occidental en un *animal* no vacunado que manifieste signos clínicos compatibles con la fiebre del Nilo Occidental o esté epidemiológicamente relacionado con un *brote* confirmado o presunto de fiebre del Nilo Occidental.

2.20.2 Lineamientos para la vigilancia epidemiológica del virus de la fiebre del Oeste del Nilo en El Salvador.

En El Salvador en el año 2003 un equipo multidisciplinario de profesionales pertenecientes al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social en coordinación con el Ministerio de Agricultura y Ganadería y Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, elaboraron un documento de referencia que contiene todos los aspectos relacionados con la vigilancia de la Fiebre del Oeste del Nilo (FON) en humanos y animales. Incluye la detección de casos toma y envío de muestras (humanos y animales), investigaciones de caso, acciones de control y sitios centinelas *(Cuadro A-9)* para la vigilancia humana, entomológica y de animales (equinos y aves migratorias) (MINSAL *et al.,* 2003).

2.20.3 Perspectiva futura.

Las epidemias del VNO en las regiones templadas son más frecuentes en períodos en los que las temperaturas estivales superan la media, por lo que se podrían incorporar modelos modernos sobre los efectos del clima y el tiempo en la transmisión del VNO al diseño de estrategias de prevención de la infección. No obstante, se desconoce si la tendencia al calentamiento global a largo plazo se traducirá en un aumento de la prevalencia de la ENO como consecuencia de las complejas interacciones que gobiernan los efectos del aumento de la temperatura en la supervivencia del vector, su distribución, los vertebrados que actúan como anfitriones de amplificación de la infección y los patrones de comportamiento del ser humano (Petersen y Hayes, 2008).

Así mismo no se ha determinado si se mantendrán las bajas morbimortalidades aviar, equina y humana, cuyas causas se desconocen, en los países situados al sur de América del Norte (Petersen y Hayes, 2008).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en el complejo de humedales del área natural protegida laguna El Jocotal *(Figura A-5),* específicamente en la periferia de dos cuerpos de agua, laguna El Jocotal y laguna Agua Caliente, conocida localmente como laguna de Chilanguera; fueron seleccionados por ubicarse en los extremos opuestos y ser representativos del complejo; el humedal se encuentra ubicado a 120 km de San Salvador, declarado sitio RAMSAR mediante Decreto Legislativo No. 689 del 18 de abril de 1996, incluye un área de 4,279 hectáreas, registradas oficialmente a favor del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales; es parte de la cuenca del rio Grande de San Miguel y abarca los municipios de El Tránsito, San Miguel, Chirilagua y Jucuarán, los tres primeros del departamento de San Miguel y el último de Usulután

Al Norte de la laguna El Jocotal, se encuentran las lavas del volcán Chaparrastique de San Miguel, que están asociadas con la infiltración de agua a la laguna; en dirección Sur existe un complejo lagunar estacional y permanente (lagunetas Agua caliente, Los Piches y San Juan), además colinda con las orillas de la sierra de Jucuarán, y un tramo del río Grande de San Miguel. Al Este y el Oeste se encuentran pastizales y cultivos de caña de azúcar, además de incluir las lavas del volcán Chaparrastique; al Oeste, existe un drenaje artificial que confluye con el río Grande. En general todo el complejo de humedales se encuentra asociado a la llanura de inundación del río Grande de San Miguel y a la laguna El Jocotal; por esta razón, todo el humedal experimenta marcados cambios en el nivel del agua; al expandirse y contraerse invade

los pantanos herbáceos, pastizales inundables y carrizales que la rodean, dependiendo de la época lluviosa o seca.

El complejo posee un clima de sabana tropical caliente, la laguna El Jocotal posee una altitud media de 30 m.s.n.m. La temperatura media anual es de 26.0 °C, con una media mensual máxima de 28.8°C en abril como mes más cálido y una mínima de 25.1°C durante diciembre. Ubicado en las Coordenadas geográficas (latitud / longitud, grados y minutos): 13º 19’ 50.6” N y 88º 14’ 53.9” O. (MARN, 2013). El humedal sustenta una diversidad de comunidades ecológicas, entre las cuales se registra una población de aves acuáticas que supera las 20,000 aves migratorias y residentes que encuentran en el humedal hábitat, refugio y alimento.

3.1 Metodología de campo.

Las unidades experimentales en estudio representaron la totalidad de caballos de la zona, con una población de 91 caballos *(Equus caballus)* pertenecientes a 29 unidades productivas incluidas en un perímetro de 5km a la redonda de los 2 espejos de agua, 4 de ellas ubicadas en la periferia del cuerpo de agua laguna El Jocotal, las cuales contabilizaron 39 caballos (43%) y 25 unidades productivas rodeando la periferia de la laguna Agua Caliente, con una suma de 52 équidos (57%).

Inicialmente se realizó un censo, para conocer las unidades epidemiológicas que residían en el área contemplada para el estudio, estableciéndose una población de 91 caballos, los cuales fueron sometidos al muestreo serológico; se utilizó el instrumento de la encuesta epidemiológica con los propietarios o encargados de los caballos, recolectándose datos pertinentes a cada individuo y antecedentes asociados a signos de enfermedad *(Figura A-6).*

La identificación de las unidades experimentales al momento del muestreo consistió en asignar una letra y número a cada individuo, la letra indicaba la unidad productiva y el número un correlativo para cada individuo. Las unidades epidemiológicas de la laguna El Jocotal se identificaron con las letras mayúsculas de la “A” a la “D”, y para la laguna Agua Caliente se asignaron las letras minúsculas iniciando desde “a” hasta la letra “x”.

Identificación de unidades productivas y de unidades epidemiológicas.

- Hacienda El jocotal, grupo A (A1, A2, A3, ... A12, A13, A14).
- Hacienda Jorge fuentes, grupo B (B1, B2, B3, ...B17, B18, B19).
- Propietario, grupo C (C1).
- Hacienda Betel, grupo D (D1, D2, D3, D4, D5).
- Chilanguera, grupos a, b, c, … v, w, x.

3.1.1 Técnica muestreo.

Se abordó la vena yugular, haciendo hemostasis con el pulgar izquierdo en el surco yugular en el tercio medio de su trayecto, se introdujo la aguja descartable doble bisel (20G 1½") en ángulo aproximado a 45º con la piel, 1 cm arriba del pulgar que hacía hemostasis (Figura A-7 y A-8). La punción se realizó con un movimiento suave y continuo, conectándose la campana tipo vacutainer e introduciendo el tubo tapón rojo al vacío sin anticoagulante, extrayéndose 8 ml de sangre. Para la obtención de suero se dejó el tubo en reposo a temperatura ambiente para la retracción del coágulo por 15 ó 20 minutos, éste se desprende de las paredes del tubo *(Figura A-9)*. El trasporte al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario del MAG, se realizó con los tubos en posición vertical y se refrigeraron en hielera a 4ºC. Cada muestra se identificó conforme a la unidad productiva a la cual pertenecían y su número correlativo. En las instalaciones del laboratorio se extrajo el suero de cada muestra con una pipeta estéril, depositándose 1.5 ml en crioviales individuales para su almacenamiento *(Figura A-10).*

3.1.2 Georreferenciación.

Durante la recopilación de datos se tomaron las coordenadas geográficas de las unidades productivas en estudio, utilizando un equipo de sistema de posicionamiento global GPS con precisión de 5 m, tomando las coordenadas geográficas (latitud y longitud en grados decimales). Con las coordenadas geográficas obtenidas, se elaboró un modelo cartográfico utilizando el sistema de información software ArcGIS 10.3.

Los datos obtenidos se ordenaron y tabularon en una tabla Excel®, trasformando dicha información a archivos Shapefile (permitiendo visualizar puntos geográficos mediante mapas descriptivos), de ésta manera se registró la ubicación espacial de las unidades productivas.

3.2 Metodología de laboratorio.

Las muestras de suero se ingresaron para su procesamiento al Laboratorio de ELISA del Ministerio de Agricultura y Ganadería, Plantel El Matazano, Soyapango, San Salvador

Prueba diagnóstica: Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos del Virus del Nilo Occidental.

3.2.1 Fundamento técnico del kit.

El kit INGEZIM West Nile COMPAC 10.WNV.K3, ha sido diseñado para detectar anticuerpos específicos frente al virus del Nilo Occidental. Es capaz de detectar títulos bajos de anticuerpos en sueros de equinos infectados. La base técnica del kit, es la del

ensayo inmunoenzimático basado en la técnica ELISA de bloqueo, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación (INGENASA, 2010).

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno viral inactivado. Cuando las muestras de suero se depositan sobre la placa, en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unen al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un anticuerpo monoclonal específico del ectodominio de la glicoproteína E conjugado con peroxidasa. Si las muestras contienen anticuerpos frente al VNO, éstos no permitirán la unión del conjugado, mientras que, si las muestras no contienen este tipo de anticuerpos, el monoclonal conjugado a peroxidasa se une libremente al antígeno de la placa (INGENASA, 2010).

Tras sucesivos lavados para eliminar el material no unido, se revelarán las reacciones acontecidas en la placa mediante la adición de un sustrato adecuado que desarrollará una reacción colorimétrica en presencia de peroxidasa. La aparición de una reacción coloreada, indicará que la muestra ensayada no contenía anticuerpos específicos al VNO y la ausencia de color indicará que la muestra es positiva y contiene dichos anticuerpos (INGENASA, 2010).

3.2.2 Composición del Kit.

- 2 Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras.
- 1 Vial con control positivo para VNO.
- 1 Vial con control negativo para VNO.
- 1 Vial conteniendo conjugado de específico.
- 1 Frasco con Solución de lavado concentrada 25X.
- 1 Frasco con diluyente (DE01-01).
- Frasco con substrato (TMB).
- 1Frasco con solución de frenado.

3.2.3 Procedimiento.

Se realizó una dilución 1/5 del suero en diluyente. Es decir, se añadió directo en el pocillo 40 µl de diluyente y luego 10 µl de la muestra, agitando suavemente para una correcta homogeneización.

3.2.3.1 Preparación de las muestras.

Se realizó una dilución 1/5 del suero en diluyente. Es decir, se añadió directo en el pocillo 40 µl de diluyente y luego 10 µl de la muestra. Se agitó suavemente para una correcta homogeneización de la mezcla.

3.2.3.2 Preparación de los reactivos

Controles.

El contenido de los frascos se presentaba listo para su uso.

3.2.3.3 Solución de lavado.

Sse diluyó una parte de la solución concentrada con 24 partes de agua destilada (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua destilada). Ya preparada la solución permaneció estable a una temperatura de 4ºC.

3.2.3.4 Conjugado.

Se presentaba listo para su uso.

3.2.4 Procedimiento.

- Se equilibraron los componentes del kit a temperatura ambiente a 24°C antes de usar.
- Adición de los controles: se añadieron 50 µl de los controles positivos y negativos usando dos pocillos por control.
- Adición de los sueros: las muestras se homogenizaron en el agitador y posteriormente se añadieron directo en el pocillo 40 µl de diluyente y luego 10 µl de cada muestra.
- La placa se agitó suavemente, se tapó con una lámina tapa placas y se incubó durante una noche por 24 horas a una temperatura ambiente.
- Cumplidas las 24 horas, se destapó la placa y haciendo uso de una pipeta automática ajustable con eyector de puntas 100 a 1000 µl, se dispensaron 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Se eliminó el contenido de la placa volcando bruscamente para evitar el intercambio de soluciones entre los pocillos.
- Se lavó 3 veces consecutivas siguiendo el mismo procedimiento.
- Antes de eliminar el contenido del último lavado, verificamos tener el conjugado atemperado, listo para su uso. El propósito fue evitar dejar la placa en seco.
- Se añadieron 50 µl del conjugado en cada pocillo. Tapando la placa e incubando por una hora a temperatura ambiente 24ºC.
- Se lavó cinco veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
- Después del último lavado se añadió a cada pocillo de la placa 50 µl de sustrato.
- Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente 24ºC; contabilizando el tiempo a partir de la adicción de la solución al primer pocillo.
- Se añadieron 50 µl de solución de frenado a cada pocillo *(Figura 11).*

- Se procedió a leer los valores de absorbancia de 450 nm en los cinco minutos, siguientes a la adicción de la solución de frenado.

3.2.5 Lectura e interpretación de resultados.

Validación de los resultados.

- El valor de densidad óptica (DO 450nm) del control negativo (CN) debe ser mayor de 0.8.
- El valor de densidad óptica (DO 450nm) de control positivo (CO) ha de ser menor de 0.35.

Interpretación de resultados.

Se calculó el porcentaje de inhibición (PI) de la muestra:

PI muestra= 100- [(DO muestra/ DO CN) X 100].

- Muestras con PI mayores o iguales a 40% se consideran como positivas.
- Muestras con PI menores o iguales a 30% se consideraron como negativas.
- Muestras con PI entre 30 y 40% se consideraron dudosas y se recomienda analizarlas por seroneutralización (INGENASA, 2010:6).

3.3 Metodología estadística.

Una vez obtenida la información de campo y laboratorio se procesó haciendo uso de estadística descriptiva por medio de cuadros, gráficas y fórmula de prevalencia *(Figuras, A-13, A-14 y A-15).*

3.3.1 Seroprevalencia.

Indica las unidades epidemiológicas en estudio que resultaron seropositivas al diagnóstico de laboratorio.

$$\text{Seroprevalencia} = \frac{\text{n° de equinos seropositivos en un punto del tiempo}}{\text{Población de equinos en ese punto del tiempo}} \times 100$$

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se evaluó la prevalencia de anticuerpos frente al virus del Nilo Occidental en una población de 91 caballos (unidades experimentales) mediante un ensayo inmunoenzimático de bloqueo ELISA con el kit Ingezim West Nile Compac. Las unidades experimentales estaban dispersas en 29 unidades productivas, en un perímetro de hasta 5km a la redonda del humedal principal laguna El Jocotal y del cuerpo de agua permanente laguna Agua Caliente *(Figura 4).* Los caballos en estudio fueron 55 hembras y 36 machos con edades que oscilaron desde los 2 meses hasta los 30 años de edad, en su mayoría fueron equinos jóvenes, criollos, con manejo principalmente a libre pastoreo y utilizados para trabajo *(Figura A-13, A-14 y A-15)*. Los resultados obtenidos arrojaron una seroprevalencia del 89.01% frente a anticuerpos contra el virus del Nilo Occidental en caballos del área natural protegida laguna El Jocotal; 6.59% reflejaron una respuesta serológica sospechosa y un 4.40% resultaron seronegativos *(Figura 5).* No se consideraron someter a evaluación las variables edad, sexo, casta y manejo de los caballos debido a que diferentes autores han manifestado no ser factores predisponentes para la infección por el VNO (Rey y Rutledge, 2001).

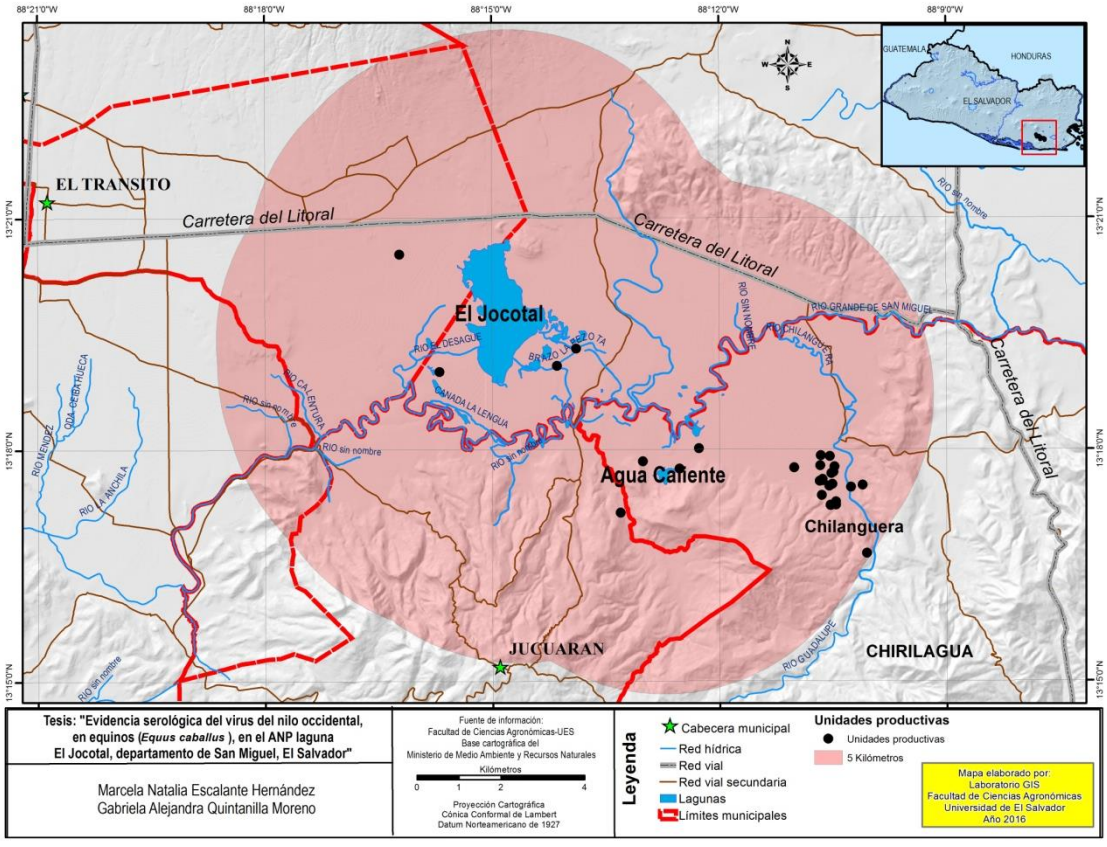


Figura 4. Ubicación geográfica de los cuerpos de agua laguna El Jocotal y laguna Agua Caliente con sus respectivas unidades productivas. *Fuente: elaboración propia.*

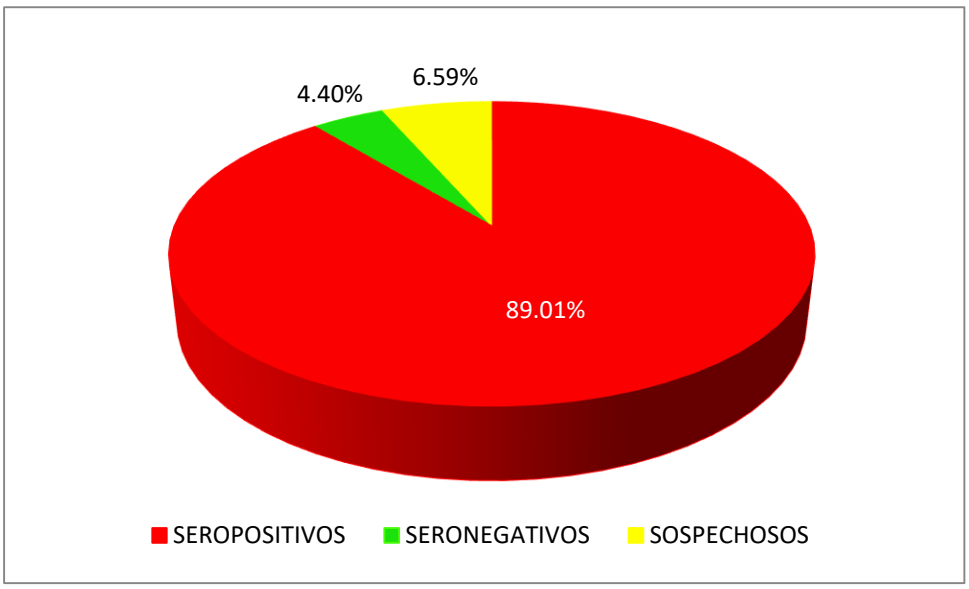


Figura 5. Resultados del diagnóstico serológico frente al virus del Nilo Occidental en caballos del área natural protegida laguna El Jocotal. Fuente: elaboración propia.

Los resultados obtenidos arrojaron una seroprevalencia alta (89.01%) de anticuerpos específicos contra el virus del Nilo Occidental en caballos del área de estudio. En Latinoamérica investigaciones similares determinaron diferentes porcentajes de seroprevalencia; en el año 2002, México reportó el nivel más alto de seroprevalencia en la región con el 62.5% (Coahuila) diagnosticados por ELISA de bloqueo y PNRP (Blitvich *et al.,* 2003), y el más bajo con el 1.2% (Yucatán) bajo la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH), y confirmado por PNRP (Loroño *et al.,* 2003). Otra investigación desarrollada en 2013, estableció una seroprevalencia de 18.6% en el estado de Guerrero (Cortés, 2013). En Guatemala entre 2003 y 2004 se estableció una prevalencia de anticuerpos del 42.3% por ELISA de bloqueo en muestras procedentes de 19 departamentos (Morales *et al.,* 2006), mientras que en Costa Rica en 2004, se determinó una seroprevalencia del 28% en caballos de la península de Nicoya (Hobson *et al.,* 2004). La respuesta serológica establecida en la presente investigación difiere a las cifras ya mencionadas en la región, muchas infecciones son asintomáticas, y en algunas zonas endémicas, se puede observar altos índices de seroprevalencia (CFSPH/IICAB, 2010). Se debe de considerar que diversos factores pueden influir en los resultados obtenidos: prueba diagnóstica utilizada, inmunización por vacunación, la proximidad de las poblaciones equinas a las zonas identificadas de riesgo y las áreas geográficas en estudio.

En relación a las pruebas diagnósticas, la presencia de otros flavivirus relacionados al serocomplejo de la encefalitis Japonesa, es un factor determinante en las altas seroprevalencias por ser asociadas a reacciones cruzadas inherentes a las pruebas serológicas (OIE, 2013), lo cual se ha demostrado en un estudio realizado en

Guatemala entre 2003 y 2004, donde 70 muestras positivas a VNO utilizando ELISA de bloqueo, fueron confirmadas por medio de PNRT, resultando solamente 9 muestras positivas al VNO, 33 al virus de la encefalitis de San Luis y 21 muestras a otros flavivirus (Morales *et al.,* 2006).

La prueba serológica ELISA de bloqueo empleada en esta investigación, posee la capacidad de detectar inmunoglobulinas IgM e IgG del VNO; lo que permitiría un amplio rango en el tiempo para la detención de anticuerpos, ya que de acuerdo a la OIE, las IgM son detectables desde los 7-10 días hasta 1 ó 2 meses después de la infección y la IgG por un tiempo superior a un año (OIE, 2013).

Otro aspecto importante a considerar es la proximidad de los caballos que habitan o deambulan en la periferia de los humedales, ya que éstos se encontraban dispersos en una distancia no mayor a 5 km para cada uno de los cuerpos de agua; a diferencia de la mayoría de publicaciones realizadas en la región Mesoamericana, en las cuales no se consideraron áreas circunscritas a humedales para la selección de las muestras en estudio. Los humedales poseen especial importancia en la epidemiología del Virus del Nilo Occidental, ya que la dimensión de estos ecosistemas, propician la transmisión del virus y el establecimiento de la enfermedad en poblaciones de humanos y caballos. Sobre la base de las consideraciones anteriores Barriga *et al.*, 2002, refiere que los tres brotes de mayor magnitud registrados en humanos han sido: Rumania 1996, Volgogrado 1999 y Nueva York 1999, ciudades localizadas cerca de grandes cuerpos de agua y en el paso de rutas de aves migratorias.
En el ecosistema del complejo laguna El Jocotal, existe una mayor probabilidad para la interacción entre los elementos de la triada epidemiológica: agente causal (virus del Nilo Occidental), hospedadores (aves migratorias y caballos) y medioambiente (humedales y mosquitos). El humedal como reserva ecológica, sustenta de manera regular una población que supera las 20,000 aves acuáticas, entre ellas migratorias y residentes, identificándose siete familias de aves de alta y moderada competencia en la trasmisión del virus *(Cuadro A-3) (Corvidae, Fringillidae, Icteridae, Charadriidae, Falconidae, Laridae, Strigidae)* (MARN, 2013).

Los caballos evaluados durante el estudio son utilizados en actividades de transporte y trabajo, además de realizar actividades de pastoreo en la periferia de los espejos de agua; teniendo como factor determinante la exposición a densas poblaciones de mosquitos los cuales interactúan con las aves migratorias y residentes.

Aunque en el humedal laguna El Jocotal no se han establecido las especies de mosquitos presentes, en El Salvador se ha demostrado la existencia de al menos dos

de las principales especies de mosquitos eficaces en la transmisión del VNO; mediante un estudio entomológico realizado en el año 2003 por el Ministerio de Salud, en el cual se identificaron larvas y adultos de las especies *Aedes aegypti, Culex nigripalpus, Culex pipiens y Cx. quinquefasciatus* (Cruz, 2003) siendo éstas dos últimas, reconocidas como vectores eficaces en la transmisión del VNO según el Centro para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública de Estados Unidos (CFSPH/IICAB, 2010). Según Clements, citado por García (2007) *Culex quinquefasciatus* es el mosquito más frecuentemente encontrado en el ambiente humano, tanto urbano como rural, está distribuido en zonas tropicales y subtropicales, frecuentando ecosistemas como humedales, lagunas y charcos temporales, presenta un rango de dispersión que no excede un radio de vuelo de más de 500m, pero excepcionalmente puede alcanzar hasta 5 kilómetros.

Se descarta que la inmunización por vacunación sea un factor responsable del alto número de caballos seropositivos, debido a que el 100% de los propietarios manifestaron nunca haber utilizado vacunas contra el VNO ni contra otras enfermedades pertenecientes al complejo de la encefalitis Japonesa, además desconocen de ellas.

En el mapa (*Figura 6),* se visualiza la ubicación de las unidades productivas con equinos seropositivos distribuidos espacialmente en una distancia de hasta 5 km a la redonda de los dos cuerpos de agua en estudio, área considerada en la investigación por la capacidad de vuelo de los mosquitos involucrados en la trasmisión del virus a humanos y equinos. La mayor concentración de los equinos seropositivos se localizó en el cantón Chilanguera del municipio de Chirilagua debido a la mayor cantidad de población equina en estrecha relación y convivencia con las poblaciones humanas y en menor proporción en cascos de hacienda de la periferia del humedal El Jocotal de los municipios El Tránsito y San Miguel, en donde existen muy pocos asentamientos humanos.

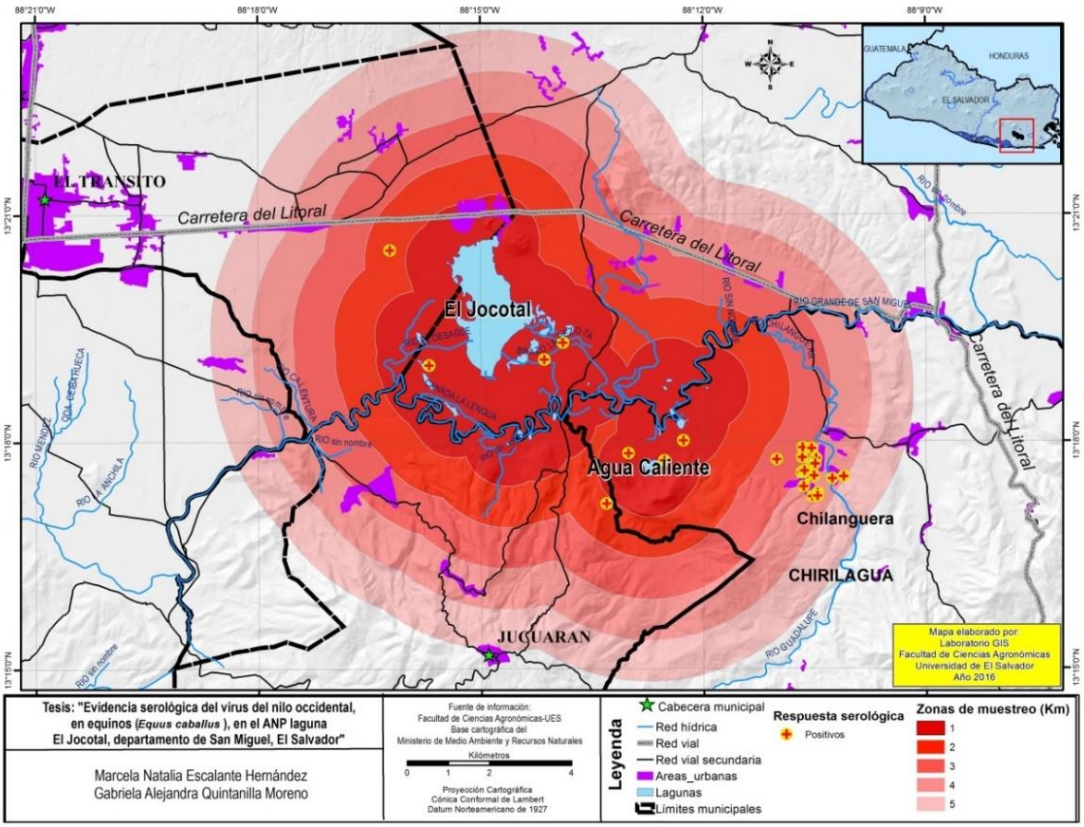


Figura 6. Distribución de las unidades productivas con equinos seropositivos a un perímetro de 5 km de los cuerpos de agua laguna El Jocotal y laguna Agua Caliente.

Fuente: elaboración propia.

5 CONCLUSIONES.

Este estudio se convierte en la primera investigación que evidencia la circulación de anticuerpos para el virus del Nilo Occidental en caballos en la periferia de un humedal RAMSAR. Los resultados fueron notificados a la Organización Mundial del Sanidad Animal (OIE) por la autoridad competente debido a que el diagnóstico se realizó en la Red de Laboratorio Veterinarios de Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador.

Mediante el uso del kit ELISA Ingezim West Nile Compac, se estableció una seroprevalencia del 89% frente al virus del Nilo Occidental en caballos del área natural protegida laguna El Jocotal, ubicada en los departamentos de San Miguel y Usulután; 6.59% reflejaron una respuesta serológica sospechosa, mientras que el 4.40% resultaron seronegativos. En el presente estudio se reporta la seroprevalencia más elevada en equinos en Latinoamérica considerando que la prueba diagnóstica utilizada, la proximidad de las poblaciones equinas a la zona de riesgo y el área geográfica en estudio pueden influir en el resultado serológico.

La seropositividad no se asocia a la inmunización por vacunación contra el VNO ni otros flavivirus, sino a un desafío natural, ya que el 100% de los propietarios manifestaron desconocer la vacuna contra el virus del Nilo Occidental y en consecuencia nunca la han aplicado.

El área natural protegida laguna el Jocotal se puede considerar como un área de riesgo para el VNO ya que según OPS, una zona de riesgo está definida por la presencia y circulación de uno o más de los virus responsables de ocasionar encefalitis equina o bien aquellas que presentan características ecológicas y medio ambientales propicias para el desarrollo y proliferación de los vectores responsables de estas zoonosis.

Los datos de georreferenciación de la población equina presentados en la investigación permitieron establecer la distribución espacial de los animales seropositivos frente al VNO, sus rutas de acceso y concentraciones de poblaciones humanas y equinas.

6 RECOMENDACIONES.

Generar estudios a nivel nacional que permitan establecer las zonas de riesgo en donde interactúan los elementos involucrados en la triada epidemiológica.

Realizar investigaciones que permitan conocer la epidemiologia del virus del Nilo Occidental en El Salvador.

Se recomienda emplear pruebas más sensibles y específicas para la confirmación de los hallazgos del presente estudio, debiéndose considerar pruebas de antígeno y tipificación de cepas. Confirmando los resultados de esta investigación con la colaboración de laboratorios de referencia de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Los hallazgos encontrados en ésta investigación deberían oriental la adopción de estrategias de vigilancia epidemiológica en salud pública y salud animal, ya que la alta seroprevalencia diagnosticada en caballos que también cumplen el rol de animales centinelas, podría estar reflejando el estatus de las infecciones contraídas en humanos por el virus de la fiebre del Oeste del Nilo en la zona de estudio.

Tomando en cuenta que los equinos también cumplen el rol de animales centinelas se recomienda establecer un programa de prevención y control por las autoridades competentes que conlleve estrategias para la vigilancia epidemiológica del VNO en áreas de salud pública y salud animal; con mayor énfasis en la implementación de una campaña de educación sanitaria a nivel nacional dirigida a profesionales de la salud humana y animal, técnicos, productores pecuarios y población en general.

Que la comisión de zoonosis interinstitucional contemple las encefalitis equinas como enfermedades prioritarias de la vigilancia epidemiológica realizada por las instituciones.

7 BIBLIOGRAFÍA.

Barriga Angulo, G; Arumir Escorza, C; Mercado Gonzales, F. 2002. Actualidades sobre la fiebre del Nilo. Revista Mexicana de Patología Clínica 4: 203-211.

Blitvich, BJ; Fernández, I; Contreras, J. 2003. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila, Mexico. Emerging infectious diseases. 9(7): 853.

Bosch, I; Herrera, F; Navarro, JC; Lentino, M. 2007. West Nile Virus, Venezuela. Emerging Infectious Diseases. 13(4): 651.

CCAES (Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias). 2013. Informe de situación y evaluación del riesgo de la fiebre por virus del nilo occidental en España. (En línea). España. Consultado 02 dic. 2014. PDF. Disponible en http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/evVNO_04_13.pdf

CDC (Centro Para el Control y la Prevención de Enfermedades). 1999. Base de datos. Mosquito species in which West Nile virus has been detected (en línea). US. Consultado 10 abr. 2016. Disponible en https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/mosquitospecies1999-2012.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2013. West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. Ed. Rev. Colorado, US. 11p.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2015. Symptoms & Treatment (en línea). Atlanta, US. Consultado 15 jun. 2016. Disponible en http://www.cdc.gov/westnile/esp/sintomas/index_en_espanol.html

CENAVECE (Centro nacional de vigilancia epidemiológica y control de enfermedades) 2003. En línea. México. Consultado 20 de jul. Del 2015, disponible en http://cenave.gob.mx/von/

CFSPH (Centro para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública, US); IICAB (Instituto para la Cooperación Internacional en Biología Animal, US). 2010. Enfermedades emergentes y exóticas de los animales: Fiebre del Nilo Occidental. Eds. Spickler, AR; Roth, JA; Gaylon, J; Lofstedt, J; Lenardón, MV.Primera ed. Iowa, Ames, US. P.25, 60-62, 170- 177.

Chancey, C; Grinev, A; Evgeniya Volkova; Rios, M. 2014. The global ecology and epidemiology of West Nile Virus. BioMed Research International. 2015 (376230): 1-20.

Ciota, AT; Kramer, LD. 2013. Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus. Viruses. 5(12): 3021–3047.

Cortés Guzmán, AJ. 2013. Identificación de mosquitos vectores potenciales y seroprevalencia del virus del Oeste del Nilo en aves y equinos en el estado de Guerrero, México. Tesis Doctorado en ciencias entomológicas. México, UANL. p 22,33-46.

Cruz, L. 2003. Epizootia de Encefalitis Equina por Virus del Nilo Occidental en El Salvador (en línea). San Salvador, SV. Consultado 19 jul. 2016. Disponible en http://www.researchgate.net/publication/237480339_Epizotia_de_Encefalitis_Equina_por_Virus_del_Nilo_Occidental_en_El_Salvador_2001-2003

García, OC; Londoño Benavidez, YL. 2007. Adaptación de *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) a tres diferentes pisos térmico bajo condiciones de laboratorio. Tesis Veterinaria, Bogotá Colombia. UNISALLE. p 4-25.

Hobson Peters, J; Arévalo, C; Cheah, WY; Blitvich, BJ. 2004. Detection of Antibodies to West Nile Virus in Horses, Costa Rica. Vector-borne and zoonotic diseases. 11(8): 1082.

Hubálek, Z; Halouzka, J. 1999. Synopses West Nile fever-a Reemerging Mosquito-Borne viral Disease (en línea). Czech Republic, Academy of Sciences Brno. Consultado 20 may. 2016. Disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627720/pdf/10511520.

INGENASA (Inmunología y Genética Aplicada, S. A., ES). 2010. Ingezim West NileCompac. Madrid, ES. P. 1-6.

Ibarra Portillo, R. 2013. Aves de El Salvador, estado actual del conocimiento e iniciativas de conservación. BIOMA. El Salvador. 1(9): 12- 19, 21-91.

Komar, O. 2003. Introducción del Virus del Nilo Occidental en América. San Salvador, SV. Aves migratorias y residentes, y el Virus del Oeste del Nilo en Centroamérica. Ed. Komar, O. (Memoria). Colorado, US. P. 16.

Loroño, MA; Blitvich, BJ; Farfán, JA. 2003 Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan, Mexico. Emerging infectious diseases. 9(7): 857-858.

MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales).1999. Listado de especies de vida silvestre amenazadas o en peligro de extinción de El Salvador (en

línea). Consultado 23 may. 2016. Disponible en http://www.marn.sv/temas/biodiversidad/vida-silvestre/especies-amenazadas-o-en-peligro-de-extincion.html

MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2013. Humedales (en línea). Consultado 12 jun. 2016. Disponible en http://www.marn.sv/temas/biodiversidad/humedales.html

McVey, DS; Wilson, WC; Gay, CG. 2015. Evolución reciente de las principales enfermedades transmitidas por vectores; West Nile Virus. Revista científica y técnica OIE. 34(2): 431- 439.

MINSAL (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social); MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería); MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2003. Lineamientos para la vigilancia epidemiológica del Virus de la Fiebre del Oeste del Nilo en El Salvador. Eds. HA Betancourt; JC Castro; MV Serpas; J Ramos; San Salvador, SV. El Salvador, MINSAL. P. 9-17.

Montecinos, JI. 2008. Análisis cualitativo de riesgo de introducción del virus Nilo Occidental en Chile. Tesis Medicina Veterinaria. Santiago, Chile, UCH. p 34-39.

Morales, ME; Morales, H; Blitvich, B. 2006. Virus del Nilo Occidental en los caballos. Emerging infectous diseases. 12(6): 1028.

Morales, MA; Barrandeguy, M; Fabbri, C; Trono, K. 2006. West Nile Virus Isolation from Equines in Argentina. Emerging Infectious Diseases. 12(10): 1559.

Morales, ME; Komar, N; Panella, N. 2013. West Nile Virus ecology in a tropical ecosystem in Guatemala. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 88(1): 115- 124.

OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal, FR). 2013. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas para los Animales Terrestres: Fiebre del Nilo Occidental (en línea). 7ª ed. París, FR. Consultado 01 jun. 2016. PDF. Disponible en http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.20_WEST_NILE.pf

OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2000. Boletín epidemiológico: El Virus del Nilo Occidental en las Américas. (En línea). Washington, D.C, US. Consultado 04 abr. 2016. Disponible en http://www1.paho.org/spanish/sha/BE_v21n4.pdf

OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Fiebre del Nilo Occidental. 3ª ed. Washington D.C., US. V. 2, p. 278- 282.

OPS (Organización Panamericana de la Salud, US); OMS (Organización Mundial de la Salud, CH). Oficina Regional para las Américas, US; OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, SV). 2013. Guía para la vigilancia, detección y respuesta para las encefalitis equinas. Eds. R Montoya; M Guardo; A Clavijo; J Naranjo; LA Espinoza; A De García. New ed., Washington D.C. US. s.n.t. 8, 58- 70 p. (Serie de manuales técnicos: 17).

Petersen, LR; Hayes, EB. 2008. Virus del Nilo Occidental en el continente americano. Clínicas médicas de Norteamérica. 92(6): 1307 – 1322.

Petracci, PF; Canevari, M; Berner, E. 2005. Guía de las aves playeras y marinas migratorias del sur de América del Sur. (En línea). Programa escuela de las aves playeras. Consultado 5 abr. 2016. Disponible en: http://awsassets.wwfar.panda.org/downloads/guia_aves_marinas_y_migratorias_sudamericanas.

Ramos, C. Falcón Lezama, JA. 2004. Salud Pública de México: La fiebre del Nilo occidental: una enfermedad emergente en México. (En línea). Cuernavaca, Morelos, Mx. Consultado 10 abr. 2016. PDF. Disponible en http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo_e2.php?id=001475 V. 46, 488-490 p

Rappole, JH; Hubalek, Z. 2003. Migratory birds and West Nile Virus. Journal of Applied Microbiology. 94 (Supl.): S47- S58.

Rey, RJ; Rutledge, CR. 2001. R,iesgo y prevención del Virus del Nilo Occidental en Caballos en Florida (en línea). Entomology and Nematology. Consultado 2 abr. 2016. Disponible en http://edis.ifas.ufl.edu.

SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal, CR). 2012. Protocolo de Vigilancia de Encefalitis Equinas. (En línea). Costa Rica. Consultado 10 abr. 2016. PDF. Disponible en http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/181212051355.pdf

Soler, D; Veras, VJ. 2009. Relación del virus del Oeste del Nilo con las aves silvestres. Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional. 5(1): 56-57.

Sotelo, E; Llorente, F; Rebollo, B; Camuñas, A; Venteo, A. 2011. Development and evaluation of a new epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to West Nile virus. Journal of virological methods.174 (1): 35-36.

Stanchi, NO. 2007. Microbiología Veterinaria: Flavivirus. Eds. PE Martino; E Gentilini; EH Reinoso; primera ed. Buenos Aires, AR. Inter- médica. P. 451

Vadillo Machota, S; Píriza Durán, S; Yanes, EM. 2002. Manual de microbiología veterinaria: Flavivirus. Primera ed. Cáceres, ES. McGraw-Hill. P. 731- 735.

Vásquez Aguilar, AA. 2009. Detención del virus del Oeste del Nilo en aves silvestres migratorias y residentes en México. Tesis Maestría en ciencias de la salud. México D.F, INP. 8- 25 p.

8 ANEXOS.

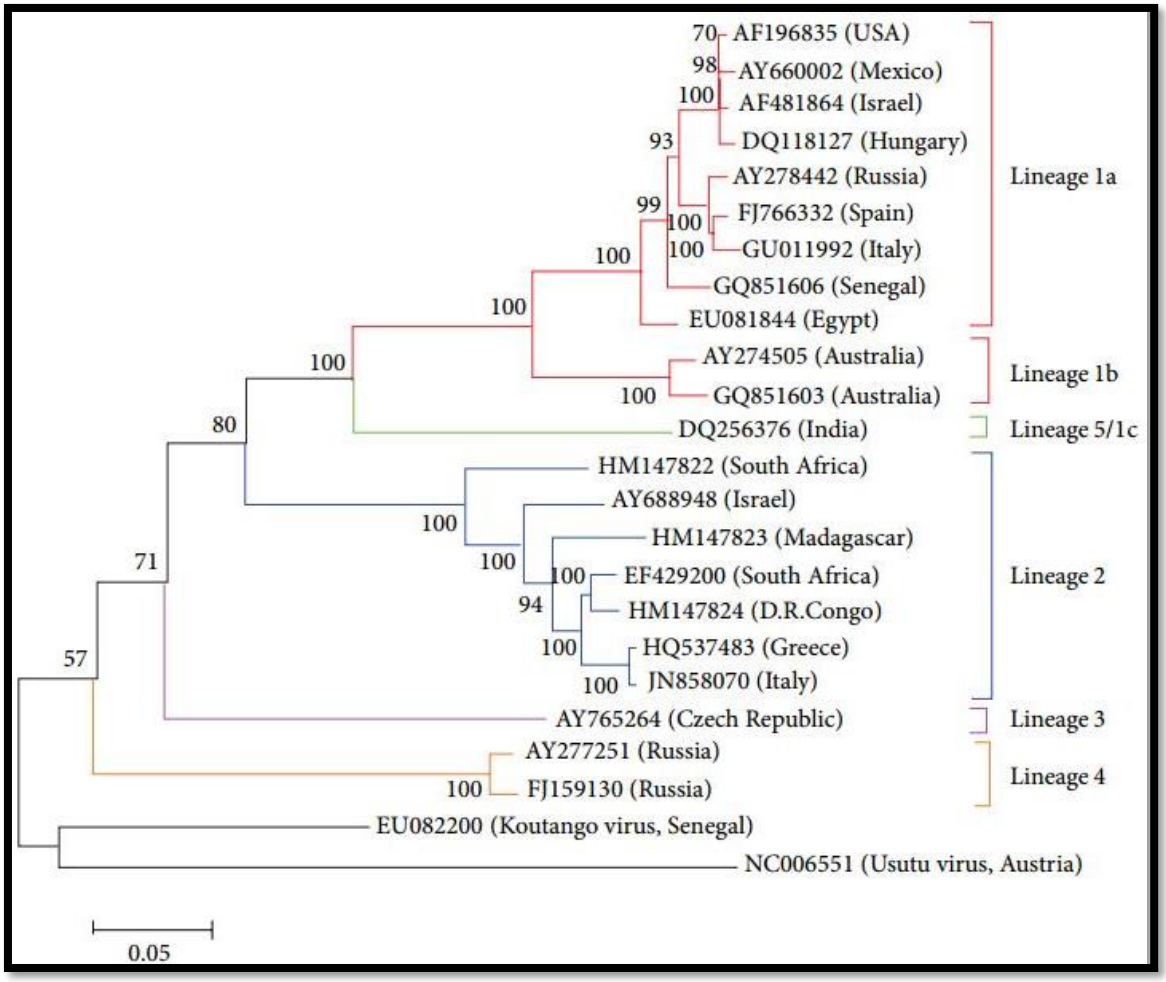


Figura A- 1. Árbol filogenético del VNO. *El árbol filogenético está basado en las secuencias genómicas completas de sus linajes vecinos más próximos con un método de búsqueda heurístico. El árbol se construyó usando el programa Mega 6 con 1000 replicaciones de arranque. En las raíces del árbol se presentan los virus Koutango y Usutu (Ciota y Kramer, 2013).*

Cuadro A-1. Encefalitis virales trasmitidas por vectores de importancia en Latinoamérica.

Enfermedad	Virus	Reservorios	Vectores	Vías de transmisión
EEV	Alphavirus de la familia Togaviridae subtipos virales denominados del I al VI	Los roedores son generalmente los huéspedes naturales para los virus endémicos en animales de la EEV.	Artrópodos de los géneros Aedes, Culex, Mansonia, Psorophora y Ochlerotatus. *Cx. (Melanoconion) portesi, Cx. (Mel.) cedecei, Cx. (Mel.) aikeni sensu lato (ocossa y paranocossa), Cx. (Mel.) taenopus, Cx. (Mel.) vomerifer, al Cx. (Mel.) pedroi y al Cx. (Mel.) adamesi.*	Ciclo enzoótico. Ciclos epidémicos en los animales o con los équidos como amplificadores.
EEE	Alphavirus de la familia Togaviridae Subtipo norteamericana, EEENA y especie sudamericana EEESA	Las aves son los principales reservorios para el virus de la EEENA, perdices, faisanes, garzas, íbices sedosos Plegadis falcinellus, palomas de los acantilados, gorriones, aves psitácidas, emús, avestruces, pingüinos africanos y grullas. En EEESA se desconoce reservorio, existe evidencia que pequeños mamíferos sean reservorio.	El virus ha sido aislado de más de 25 especies de mosquitos, el vector más importante en el ciclo enzoótico es el *Culiseta melanura, Coquilletidia perturbans* y miembros de los géneros Aedes, Ochlerotatus y Culex.	La EEE al igual que la EEO, son ocasionados por virus que se mantienen en un ciclo entre las poblaciones de aves y son transmitidas principalmente por mosquitos.
EEO	Alphavirus de la familia Togaviridae	Las aves son los reservorios habituales de la EEO, pero el virus también puede hacer un ciclo en poblaciones de conejos.	El vector más importante es el *Culex tarsalis* y otros vectores significativos con el *Aedes melanimon*, el *Aedes dorsalis* y el *Aedes campestris.*	Al igual que la EEE el virus de la EEO se mantiene en la naturaleza en un ciclo entre poblaciones de aves y mosquitos que son sus principales transmisores.

(OPS *et al.,* 2013)

Cuadro A- 2. Enfermedades diferenciales de las encefalomielitis equinas

Enfermedad	Etiología y epidemiología	Hallazgos clínicos y de laboratorio	Tratamiento y control
Rabia	Todas las edades. Conocimiento de la enfermedad en animales silvestres en el área. Un solo animal afectado.	Parálisis ascendente. Ataxia y paresia del tren posterior, parálisis faríngea, cólico, pérdida de tono en cola y esfínter anal, fiebre. Muerte en 1 semana. Inmunofluorescencia en cerebro.	No existe. Todos mueren. Vacunación anticipada para prevención.
Mioencefalomielitis por herpes virus (EHV-1)	Puede observarse brotes de enfermedad. Enfermedad neurológica precedida por fiebre en animales maduros.	Ataxia simétrica y paresia, parálisis vejiga urinaria.	No existe terapia específica. Antiinflamatorios, corticosteroides controversial. Recuperación espontánea en casos.
Mioencefalomielitis por protozoos	*Sarcocystes neurona.* Un solo animal afectado. Infecciosa pero no contagiosa.	Desórdenes en el sistema nervioso central con ataxia.	Desparasitantes para protozoos (pirimetamina, sulfonamida).
Nematodiosis cerebroespinal (encefalitis verminosa)	Migración de estadios larvarios de *Strongylus vulgaris, Habronema sp.*	Hipotonía, atrofia muscular y cerebral. Encefalitis progresiva, incoordinación, ceguera. Hemorragias en SNC.	Ivermectina, altas dosis de benzimidazoles. Antiinflamatorios. Control de parásitos.
Leuconcefalomalasia equina	Alimentación con granos contaminados con *Fusarium moniliforme* (hongo).	Incoordinación, tremor muscular, arritmia cardíaca, debilidad, disfagia, depresión.	Ninguno.
Intoxicación por plomo	Pastoreo en potreros contaminados (no común).	Enfermedad crónica. Disnea inspiratoria por parálisis del nervio laríngeo recurrente. Parálisis laríngea, neumonía por aspiración, parálisis labial, debilidad.	Versenato de calcio
Botulismo	Ingestión de toxina botulínica en ensilaje, granos o heno (esporádica).	Parálisis de los músculos esqueléticos. Dificultad para caminar, postración. Parálisis lingual. Muerte de 2 a 4 días.	Terapia de soporte, antitoxina, vacunación en áreas enzoóticas.
Tétano	Heridas infectadas con *Cl. tetani* (esporádica).	Tetania generalizada de músculos esqueléticos. Fiebre, hiperestesia, protrusión del tercer párpado, trismo. Dificultad para caminar, postración con convulsiones tetánicas. Muerte en 5- 10 días.	Pronóstico desfavorable. Ubicación en lugar oscuro. Penicilinas, relajantes musculares, terapia de soporte; antitoxina parenteral. Vacunación con toxoide.

(OPS *et al.,* 2013)

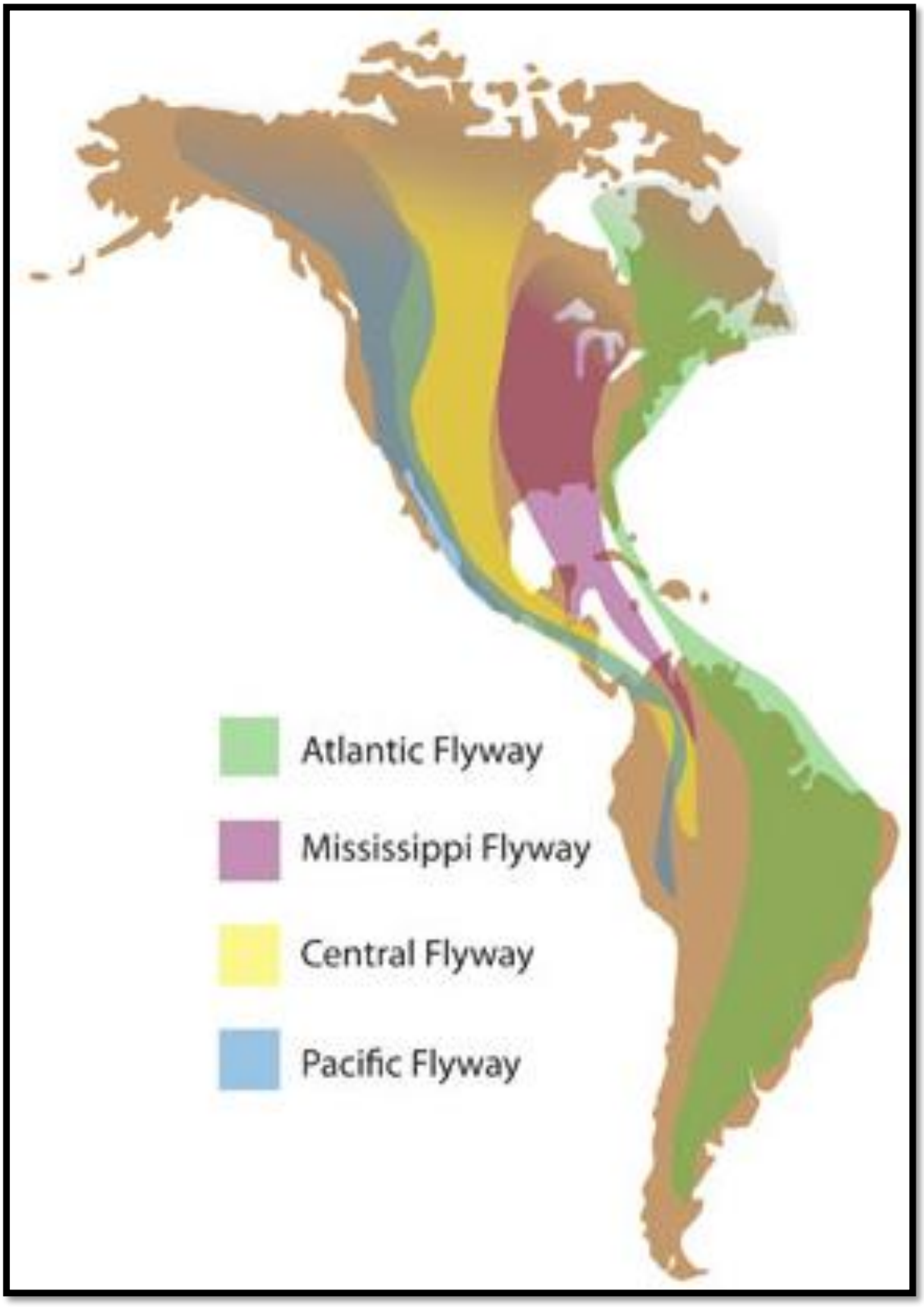


Figura A- 2. Principales rutas migratorias en el continente Americano.

(Petracci *et al.,* 2005)

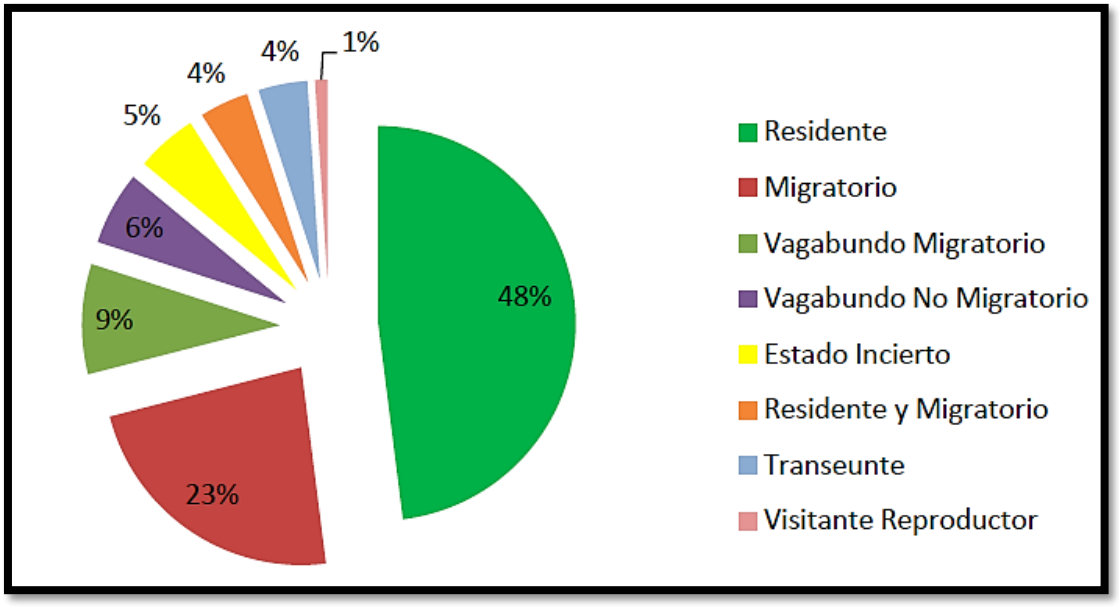


Figura A-3. Porcentaje de especies aviares de acuerdo a su estado para El Salvador *(Ibarra, 2013).*

Residentes (R) son de los que se ha confirmado anidación mediante el hallazgo de un nido con huevos o polluelos y juveniles. En el caso de Migratorias (M) son las que viajan regularmente a los trópicos durante la estación seca, lluviosa y en periodos transicionales (octubre-abril). La categoría de Residentes y Migratorias (RM) antes Migratorio Parcial (MP), engloba aquellas especies que presentan tanto una población reproductora como una migratoria. Otras categorías son estado incierto (X) concierne a las especies de las cuales se sospecha anidación, pero que hasta el momento no se ha confirmado. Los Transeúntes (T) son especies que sólo van de paso ocupando el país para llegar a sus territorios de invierno. Los Vagabundos no ocurren regularmente en El Salvador, pero se cuenta con pocos registros, los hay migratorios (VM) (aquellos que se mueven de sus territorios de invierno al país) y no migratorios (VNM) (aves que ocurren en la región y que por eventos especiales se desplazan al país) y finalmente los Visitantes Reproductores (VR), migran desde Sudamérica para anidar en América Central.

Figura A-4. Sitios Ramsar El Salvador. Se señala el área natural protegida laguna El Jocotal (MARN, 2013).

Cuadro A- 3. Listado de aves identificadas en el humedal laguna el Jocotal, que son competentes en la trasmisión al VNO.

Competencia	Familia	Nombre Científico	Nombre común	Estado
Competencia alta en la trasmisión del VNO.	Corvidae (CFSPH/IICAB, 2010) (Komar, 2003).	Calocitta formosa	Urraca	R
	Fringillidae (Komar, 2003).	Carduelis psaltria	Jilguero menor	R
	Icteridae (Komar, 2003).	Agelaius phoeniceus	Cordelín	R
		Quiscalus mexicanus	Clarinero, zanate	R
		Icterus pustulatus	Chiltota espalda rayada	R
		Icterus gularis	Chiltota	R
Competencia media en la trasmisión del VNO.	Charadriidae (CFSPH/IICAB, 2010) (Komar, 2003).	Charadrius wilsonia		R
	Falconidae (CFSPH/IICAB, 2010) (Komar, 2003).	Falco sparverius		R
		Caracara plancus	Querque	R
		Herpetotheres cachinnans	Guaxe, halcón guaco	R
	Laridae (Komar, 2003).	Larus atricilla	Gaviota reidora	M
		Sterna fuscata		
		Sterna caspia	Golondrina de mar	M
		Sterna máxima		M
		Chlidonias niger	Golondrina de mar	M, Am
		Rynchops niger	Rayador americano	
	Strigidae (CFSPH/IICAB, 2010) (Komar, 2003).	Ciccaba virgata	Pájaro león	R
		Glaucidium brasilianum	Tecolotito bajeño, aurora	R

Claves: R: Residente, M: Migratorio hemisferio norte, Am: Amenazada de Extinción. Fuente: Fuente: elaboración propia, tomada del listado de fauna aviar MARN, 1999.

Cuadro A-4. Detención temprana de casos con síndrome neurológico en equinos.

Objetivo	Detectar tempranamente la presentación del síndrome neurológico en équidos (caballos, mulas y asnos), con el fin de proporcionar una oportuna atención y promover y desencadenar una serie de medidas de prevención y de vigilancia.
Ámbito	Nacional, es decir que la notificación y estudio laboratorial de todo caso en équidos que cumple con la definición de caso probable de EE, es una acción de vigilancia que debe operar en todo el territorio del país, independientemente si se trata o no de una zona considerada de riesgo.
Temporalidad	Permanente, es decir que la aplicación de la definición de caso probable de EE, debe de darse durante todos los meses del año, al tiempo que se intensificará según alertas epidemiológicas.
Actores	• Los sensores, médicos veterinarios públicos y privados, zootecnistas, prácticos pecuarios, ganaderos, caballistas, empleados de consultorios, laboratorios y clínicas veterinarias, funcionarios de locales de salud animal, secretarías locales de agricultura, consejos locales de zoonosis, etc. De todo el país deben conocer y aplicar la definición de caso probable de EE en équidos y las acciones de laboratorio que orienta el protocolo de vigilancia del caso. • Instancias de vigilancia de salud animal de los niveles nacional e intermedio.
Aspectos metodológicos	**Detección de caso para la detección del Síndrome Neurológico Equino (SNE).** • Síndrome neurológico en los équidos: conjunto de signos y síntomas que incluye entre otros depresión profunda, anorexia, somnolencia, tambaleo al caminar, torneo, rechinar de dientes, caída del labio inferior y parálisis. • Caso: alusivo a un animal afectado por la enfermedad. • Caso probable: todo équido que presente SNE y fiebre, que no tiene historia de vacunación vigente contra encefalitis. • Caso confirmado: animal que presenta SNE y fiebre, o animales en contacto con éste con resultados positivos a pruebas oficiales de diagnóstico de laboratorio. • Foco: predio con uno o más casos. • Brote: dos o más focos en una misma área geográfica cuyo inicio en cada uno de ellos no sea mayor de 3 a 5 días. • Epizootia- endemia: manifestación de enfermedad en grupos de casos, animales o humanos respectivamente, dentro de una región geográfica específica, los cuales sobrepasan lo esperado desde el punto de vista epidemiológico. **Actividades.** Ante la sospecha de SNE y análisis según la definición de caso probable de EE se procede a la notificación inmediata del caso a la autoridad de salud animal competente según instrumento establecido, formulario y toma y envío de muestras al laboratorio nacional de referencia de salud animal. **Muestras.**

	Aislamiento vial o técnicas moleculares. ○ Sangre heparinizada o suero de animales febriles tomados en un estadio inicial de la infección y estrechamente asociados con casos clínicos de encefalitis. ○ Cerebro, páncreas y médula espinal de équidos con signos neurológicos. ○ Un juego completo de tejidos en formalina al 10% de équidos muertos o sacrificados recientemente. ○ Muestras frescas de corazón, cerebro e hígado de aves. ○ Muestras de cerebro, corazón, riñón, bazo, hígado e intestino de aves fijadas con formalina al 10%. Pruebas serológicas. ○ Sueros pareados de équidos o LCR de équidos no vacunados tomados durante la fase febril de 4 a 7 días después durante la fase convaleciente. ○ Sueros de aves o hisopos orales o cloacales. **Diagnóstico de laboratorio.** **Hallazgos**: casos probables y casos confirmados de EE y casos probables de otras causas de síndrome neurológico.

(OPS *et al.*, 2013).

Cuadro A- 5. Caracterización y monitoreo de riesgo estudios seroprevalencia en humanos.

Objetivo	Identificar zonas o grupos de humanos con evidencia de transmisión de EE con el fin de intensificar la vigilancia y promover acciones de prevención.
Ámbito	Zonal, es decir que los estudios poblacionales de seroprevalencia se realizarán sólo en zonas seleccionadas consideradas de riesgo, bien porque en ellas se haya determinado previamente la presentación de los ciclos endémicos en animales de transmisión o por que se presenten las condiciones ecológicas y medioambientales propicias para el desarrollo y proliferación de vectores responsables de la transmisión de las EE.
Temporalidad	Puntual, al inicio para conocer la seroprevalencia en las zonas consideradas de riesgo y periódica en las zonas identificadas con riesgo de transmisión enzoótica.
Actores	• Instancias de salud pública de los niveles nacional e intermedio. • Laboratorio Nacional de Referencia y laboratorios de salud pública de los niveles intermedios. • Nivel local de salud de las zonas seleccionadas.
Aspectos metodológicos	**Actividades:** recolección de datos poblacionales, diseño del tamaño muestral, elaboración de la encuesta, toma y envío de las muestras y procesamiento de laboratorio. **Diagnóstico de laboratorio:** ELISA – IgG, IH, PRNT. **Hallazgos**: determinación de tasas de seroprevalencia en la población de zonas seleccionadas consideradas de riesgo.
Acciones que desencadena	De manera inmediata no desencadena acciones en la medida que los hallazgos no significan transmisión actual.

(OPS *et al*., 2013).

Cuadro A-6. Estudios entomológicos

Objetivo	Identificar reservorios de la fauna silvestre responsables de perpetuar la transmisión de los ciclos endémicos de las EE animales.
Ámbito	Zonal, en zonas endémicas en animales seleccionados y en zonas de estuarios y rutas de aves migratorias.
Temporalidad	Puntual, al inicio de la caracterización en algunas zonas consideradas de riesgo enzoótico y periódica, en las zonas ya definidas como de riesgo para la transmisión de EE.
Actores	Autoridades ambientales de los niveles nacional e intermedio, laboratorio de referencia.
Aspectos metodológicos	**Actividades:** identificación y caracterización de la fauna silvestre presente en las zonas de riesgo de transmisión enzoótica de las EE y en los estuarios y zonas de rutas de aves migratorias, muestreo y captura de especímenes mediante trampas y mallas, colocación de aves centinela- pollos en zonas de estuarios y rutas migratorias, toma y envío de muestras, procesamiento de laboratorio. **Diagnóstico de laboratorio:** aislamiento viral, RT-PCR, IH, PRNT. **Hallazgos**: determinación de actividad viral en reservorios silvestres responsables de la transmisión enzoótica de las EE y definición del papel preponderante de algunas especies en la transmisión de los virus.
Acciones que orienta	• Vigilancia rutinaria en humanos. • Encuesta de seroprevalencia en humanos. • Vigilancia del síndrome neurológico equino. • Determinación de la circulación viral en animales domésticos. • Vigilancia entomológica. • Vigilancia de mortalidad en aves.

(OPS *et al*., 2013).

Cuadro A-7.Detencción de mortalidades en aves silvestres.

Objetivo	Detectar mortalidad de aves silvestres con la finalidad de estar alerta ante la presentación de posibles riesgo de transmisión de las Encefalitis equina del Este (EEE), del Oeste (EEO) y del Nilo Occidental (ENO).
Ámbito	Zonal, en zonas seleccionadas de riesgo de presentar los ciclos endémicos en animales de transmisión y en zonas aledañas a estuarios y rutas de aves migratorias.
Temporalidad	Permanente, para las zonas definidas como de riesgo para la transmisión enzoótica y estacional para las épocas de migración de aves.
Actores	Autoridades ambientales de los niveles nacional e intermedio, laboratorio de referencia.
Aspectos metodológicos	**Actividades:** registro de la mortalidad de aves silvestres, notificación por sensores, captura, toma y envío de muestras, procesamiento de laboratorio. **Diagnóstico de laboratorio:** aislamiento viral, RT-PCR, IH, PRNT. **Hallazgos**: mortalidad, registros de especies incriminadas, susceptibilidad, resistencia, tasas de infección.
Acciones que orienta	• Vigilancia intensificada en humanos. • Vigilancia del síndrome neurológico equino. • Determinación de la circulación viral en animales domésticos. • Vigilancia entomológica.

(OPS *et al*., 2013).

Cuadro A-8. Circulación viral en reservorios silvestres y centinelas.

Objetivo	Identificar reservorios de la fauna silvestre responsables de perpetuar la transmisión de los ciclos endémicos de las encefalitis en animales.
Ámbito	Zonal, en zonas endémicas en animales seleccionados y en zonas de estuarios y rutas de aves migratorias.
Temporalidad	Puntual, al inicio de la caracterización en algunas zonas consideradas de riesgo enzoótico y periódica, en las zonas ya definidas como de riesgo para la transmisión de las EE.
Actores	Autoridades ambientales de los niveles nacional e intermedio, laboratorio de referencia.
Aspectos metodológicos	**Actividades:** identificación y caracterización de la fauna silvestre presente en las zonas de riesgo de trasmisión enzoótica de las EE y en los estuarios y zonas de rutas de aves migratorias, muestreo y captura de especímenes mediante trampas y mallas, colocación de aves centinelas- pollos en zonas de estuarios y rutas de aves migratorias, toma y envío de muestras, procesamiento de laboratorio. **Diagnóstico de laboratorio:** aislamiento viral, RT-PCR, IH, PRNT. **Hallazgos**: determinación de la actividad viral en reservorios silvestres responsables de la transmisión enzoótica de las EE y definición del papel preponderante de las algunas especies en la transmisión de los virus.
Acciones que orienta	• Vigilancia rutinaria en humanos. • Encuestas de seroprevalencia en humanos. • Vigilancia del síndrome neurológico equino. • Determinación de la circulación viral en animales domésticos. • Vigilancia entomológica. • Vigilancia de mortalidad de aves silvestres.

(OPS et al*., 2013).*

Cuadro A-9. Sitios centinelas para la vigilancia entomológica y animal (equinos y aves) de la fiebre del Oeste del Nilo.

Departamento de Santa Ana.
• Lago de Guija.
• Río Ostúa.
• Laguna de Metapán.
• Laguna de San Diego.
• Laguna Clara.
• Laguna Teconalá.
Departamento de Ahuachapán.
• Barra de Santiago (punta de Cuisapa).
Departamento de Chalatenango.
• Embalse del Cerrón Grande.
• Colima
• Santa Bárbara.
• El Tablón.
• Sogate.
• San Cristóbal.
• Isla Tule.
Departamento de San Salvador.
• Lago de Ilopango.
• Zoológico Nacional.
Departamento de La Paz.
• Estero de Jaltepeque. (Guadalupe de La Zorra).
Departamento de Usulután.
• Río Lempa (Bocana- La Pita).
Departamento de San Miguel.
• Laguna de Olomega.
• Laguna El Jocotal.

(*MINSAL et al., 2003).*

Figura A-5. Fotografía laguna El Jocotal.

Figura A-6. Censo de población equina.

Figura A-7. Toma de muestras equinas.

Figura A-8. Punción vena yugular.

Figura A-9. Muestras de sangre en reposo para obtención del suero.

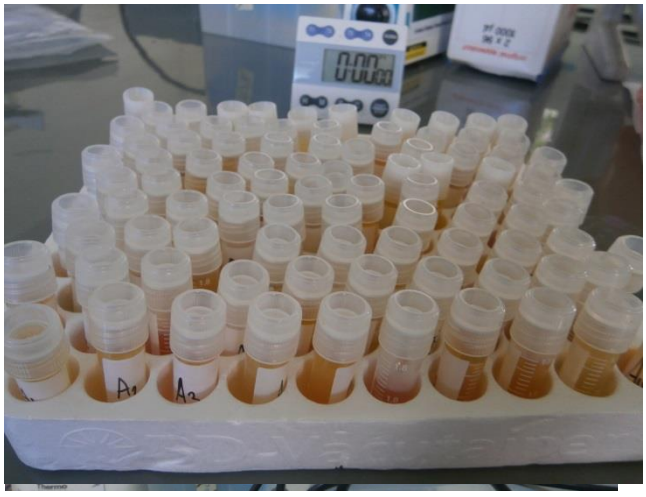


Figura A- 10. Muestra serológica depositadas en crioviales.

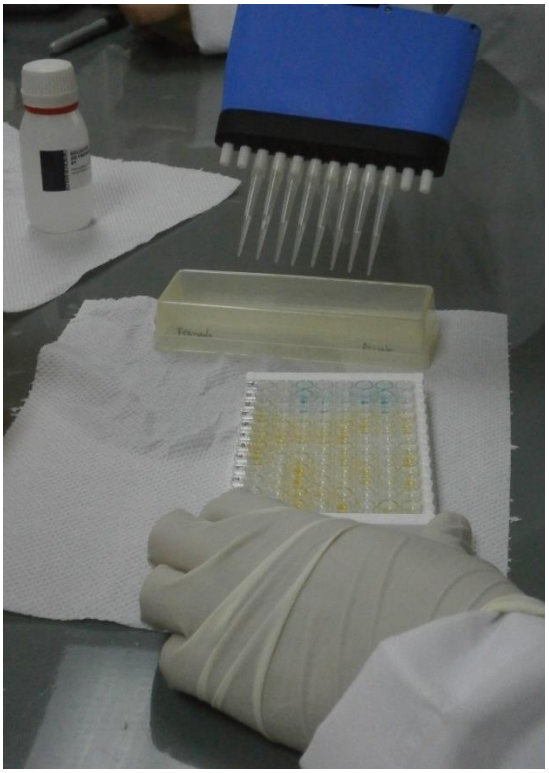


***Figura A-11. Solución de frenado* para dilucidar reacción colorimétrica.**

Figura A- 12. Lectura de valores de absorbancia

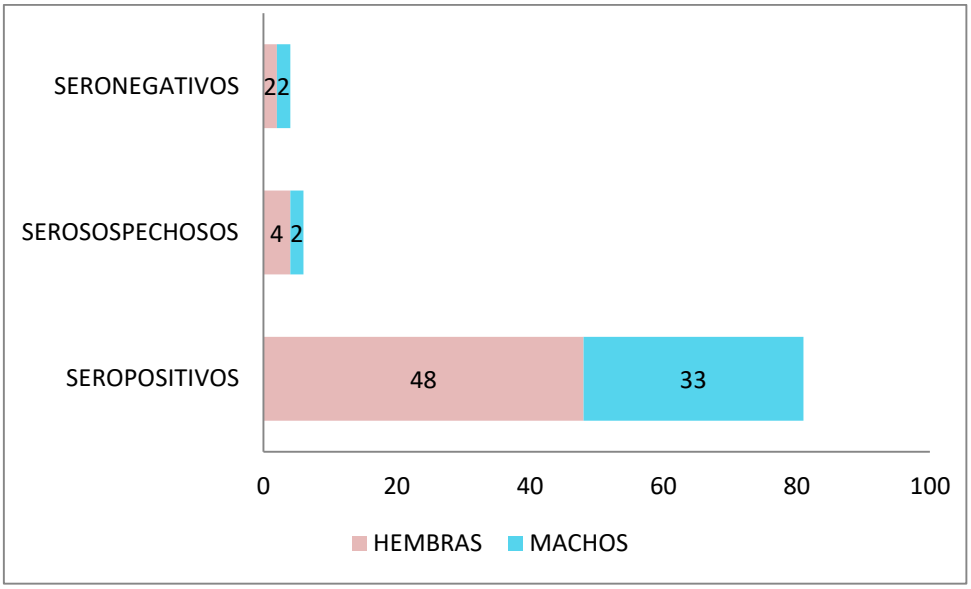
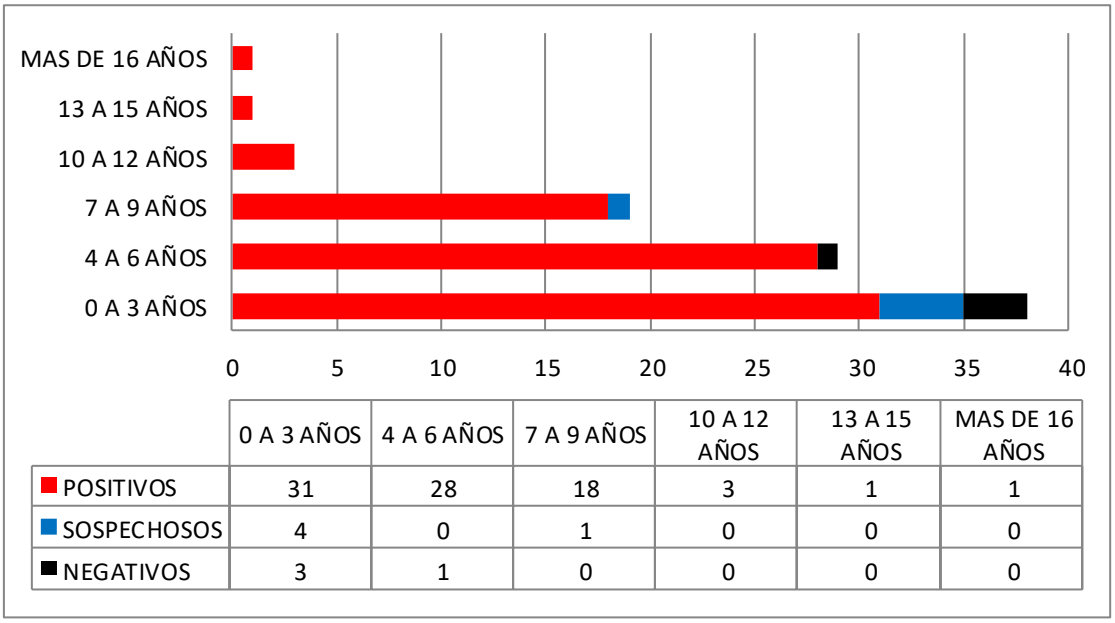


Figura A- 13. Clasificación del sexo de los equinos y resultados serológicos.



	0 A 3 AÑOS	4 A 6 AÑOS	7 A 9 AÑOS	10 A 12 AÑOS	13 A 15 AÑOS	MAS DE 16 AÑOS
POSITIVOS	31	28	18	3	1	1
SOSPECHOSOS	4	0	1	0	0	0
NEGATIVOS	3	1	0	0	0	0

Figura A- 14. Categoría de edades y resultados serológicos.

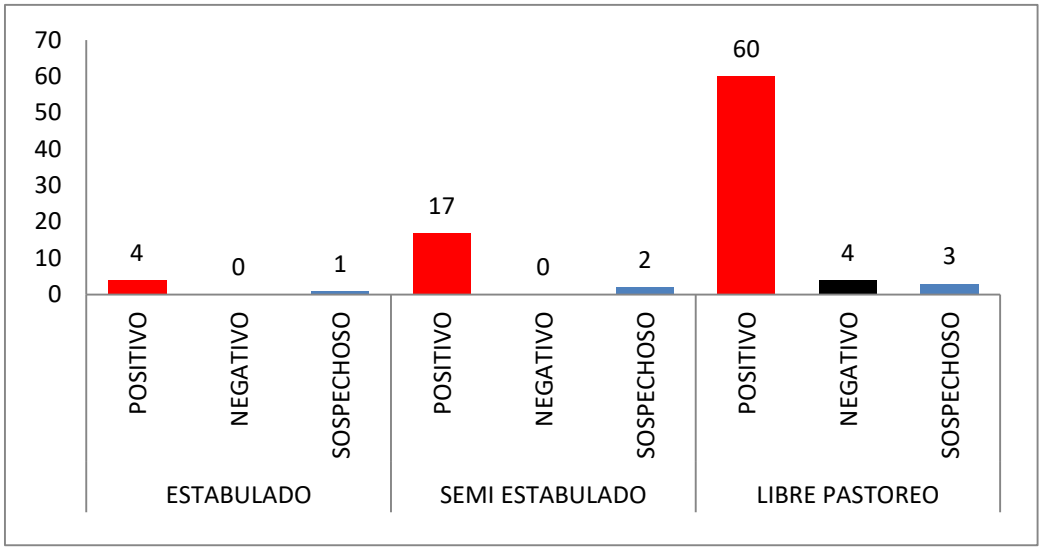


Figura A-15. Manejo de los equinos y resultados serológicos.