









Original

Vigilancia epidemiológica del virus Occidental del Nilo en las llanuras orientales de Colombia

Diana P. Barajas P^{1*}  Ph.D; Karl A. Ciuderis A²  M.Sc; Dario Cárdenas G¹  Ph.D;
Agustín Góngora O³  Ph.D; Jorge Osorio B²  Ph.D; Camilo E. Pacheco P¹  M.Sc;
Nestor I. Monroy O¹  M.Sc; Gloria D Tovar B⁴  M.Sc.

¹Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Grupo Los Araucos. Villavicencio, Meta, Colombia.

²University of Wisconsin, Department of Pathobiological Sciences. Animal Health & Biomedical Sciences Building. Madison. Wisconsin. United States

³Universidad de los Llanos. Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Grupo GIRGA, Villavicencio, Meta, Colombia.

⁴Instituto Colombiano Agropecuario. Villavicencio, Meta, Colombia.

*Correspondence: dianap.barajas@campusucc.edu.co

Recibido: Mayo 2019; Aceptado: Agosto 2019; Publicado: Enero 2020.

RESUMEN

Objetivo. Identificar la presencia del virus del Oeste del Nilo en equinos y mosquitos en ocho municipios del departamento del Meta. **Materiales y métodos.** La investigación contó con el aval del Comité de bioética de la Universidad de los Llanos. Se analizaron mediante pruebas serológicas y moleculares 613 muestras de equinos criollos y de raza cuarto de milla, destinados a actividades deportivas y de trabajo, con un rango de edad de 2 a 15 años, en los transectos: Villavicencio-Restrepo-Cumaral, San Martín - Castilla la Nueva-Granada y Puerto López-Puerto Gaitán, analizados en 62 pool y 213 mosquitos. Los pool de sueros de equinos y mosquitos fueron analizados por ELISA y PCR. **Resultados.** No se encontraron animales seropositivos mediante la prueba de ELISA y las pruebas moleculares también fueron negativas. **Conclusiones.** Aunque en este estudio no se evidenció la presencia de anticuerpos IgM por la técnica de Elisa y las pruebas moleculares (RT-PCR) también fueron negativas para circulación viral, en los municipios objeto de estudio, es importante indicar que la detección molecular en sueros, requiere unos niveles de viremia representativos y que el animal se encuentre en la fase aguda de la enfermedad. Aunque es posible que la población equina se mantenga libre de contacto con el virus, se debe mantener la vigilancia epidemiológica frente a este importante patógeno para la salud humana, especialmente por la presentación de brotes de otros virus zoonóticos como la Encefalitis Equina del Este y Encefalitis Equina Venezolana en los departamentos del Meta y Casanare, contiguo a este.

Palabras clave: Epidemiología; flavivirus; zoonosis; reacción en cadena de la polimerasa (*Fuente: DeSC*).

ABSTRACT

Objective. Identify the presence of West Nile virus in horses and mosquitoes in eight municipalities of the department of Meta. **Materials and methods.** The research was supported by the Bioethics Committee of the University of Los Llanos. 613 samples of Creole and quarter-mile equine horses, intended for sports and work activities, with an age range of 2 to 15 years, were analyzed using serological and molecular tests in the transects: Villavicencio-Restrepo-Cumaral, San Martín- Castilla la Nueva-Granada and Puerto López-Puerto Gaitán, analyzed in 62 pools and 213 mosquitoes. The pool of sera of horses and mosquitoes were analyzed by ELISA and PCR. **Results.** No seropositive animals were found by the ELISA test and molecular tests were also negative. **Conclusions.** Although in this study the presence of IgM antibodies was not evidenced by the Elisa technique, and molecular tests (RT-PCR) were also negative for viral circulation, in the municipalities under study, it is important

Como citar (Vancouver).

Barajas PD, Ciuderis AK, Cárdenas GD, Góngora OA, Osorio J, Pacheco PC et al. Vigilancia epidemiológica del virus Occidental del Nilo en las llanuras orientales de Colombia. Rev MVZ Córdoba. 2020; 25(1):e1252. DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1252>



©El (los) autor (es), Revista MVZ Córdoba 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

to indicate that the molecular detection in sera, it requires representative levels of viremia and that the animal is in the acute phase of the disease. Although it is possible that the equine population remains free of contact with the virus, epidemiological surveillance should be maintained against this important pathogen for human health, especially due to the outbreak of other zoonotic viruses such as Eastern Equine Encephalitis and Encephalitis Venezuelan Equine in the departments of Meta and Casanare, adjacent to this.

Keywords: Epidemiology; flavivirus; zoonoses; polymerase chain reaction (*Fuente: DeSC*).

INTRODUCCIÓN

El virus del Nilo occidental (VNO), es un patógeno emergente zoonótico que circula entre aves, se transmite por mosquitos y ha alcanzado gran importancia por su impacto sobre la salud humana y animal (1). Es un virus ARN de polaridad positiva que pertenece al género *flavivirus* que agrupa más de 70 virus, entre los que se incluye el virus del dengue, la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas y el virus de San Louis (2), tiene un virión icosaédrico derivado de las membranas celulares del huésped de aproximadamente de 50 nm (3).

Los humanos y equinos son los hospederos incidentales terminales del virus, a los que ocasiona una enfermedad que puede ir desde leve hasta altamente mortal (4). En los humanos la infección ocurre de forma asintomática, sin embargo cerca de 20% de los pacientes puede presentar signos clínicos de gripa y fiebre alta en donde por lo menos el 1% de los infectados pueden sufrir una enfermedad neuroinvasiva altamente fatal (1). Los equinos pueden desarrollar signos clínicos más severos que los humanos, caracterizados por encefalitis, ataxia, debilidad de las extremidades, recumbencia y tremor muscular (5), llegando a alcanzar una mortalidad hasta del 40%, por tanto, la vigilancia epidemiológica sobre estos se convierte en un buen predictor de las infecciones en humanos (6).

El VNO hizo su aparición por primera vez en 1937 en Uganda, desde donde se diseminó a Asia, África, Oriente medio, Sur de Europa, Australia y América (7). En EU apareció en 1999 (8) y en la siguiente década se reportó en Canadá, México, Guatemala, Islas del Caribe, Argentina y Venezuela (9). En la actualidad el virus se ha diseminado por la mayoría de regiones tropicales y subtropicales del mundo, siendo notoria la aparición de nuevas cepas con mayor patogenicidad en los nuevos brotes (1). Dentro del ciclo de transmisión se han identificado 59 especies de mosquitos que han resultado infectados por este virus (10).

En Colombia los estudios sobre VNO señalan la presencia de anticuerpos y circulación natural

en equinos del Departamento de Córdoba (11) y Antioquia (12), junto con el aislamiento y caracterización molecular y filogenética de un virus obtenido de flamings cautivos en este último Departamento (13). Posteriormente, se aisló un nuevo virus que presentó características filogenéticas y filo geográficas similares a la cepa aislada en Texas (14). A pesar de estos importantes hallazgos, no se ha reportado casos fatales en humanos y equinos, lo que aumenta el enigma sobre el comportamiento epidemiológico de este virus.

El Ministerio de Salud en la actualidad, considera el VNO como un patógeno de importancia para Colombia y sugiere establecer vigilancia epidemiológica (15). En el departamento del Meta y en general la Orinoquia, se conjugan las características geográficas y epidemiológicas para iniciar esta vigilancia, entre ellas, la alta diversidad biológica, la ubicación en la ruta migratoria de la aves a su paso hacia el sur del continente, en donde se han presentado brotes epidémicos (16), alta aglomeración de aves en ciertas épocas del año y la estrecha relación entre aves, mosquitos, equinos y otros mamíferos silvestres. El objetivo de este estudio fue identificar mediante pruebas serológicas y moleculares la presencia del VNO en equinos y mosquitos de ocho municipios del departamento del Meta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aval del comité de ética. La investigación contó con el aval previo del Comité de bioética de la Universidad de los Llanos para experimentación con animales. Los métodos de recolección, procesamiento, preservación y envío de muestras siguieron las directrices de bioseguridad propuestas por la OMS, al igual que las sugeridas por el Comité de Recursos de Investigación Animal de la Universidad de Wisconsin.

Área de estudio, condiciones socioeconómicas y climáticas. El estudio se realizó en ocho municipios del departamento del Meta que se comunican con su capital, Villavicencio mediante 3 transectos. El primero incluyó muestras de equinos entre Villavicencio, Restrepo

y Cumaral, el segundo entre Sanmartín, Castilla la Nueva y Granada y el tercero entre Puerto López y Puerto Gaitán, durante los meses Junio-Diciembre 2014 y Enero-junio 2015. (Figura 1).

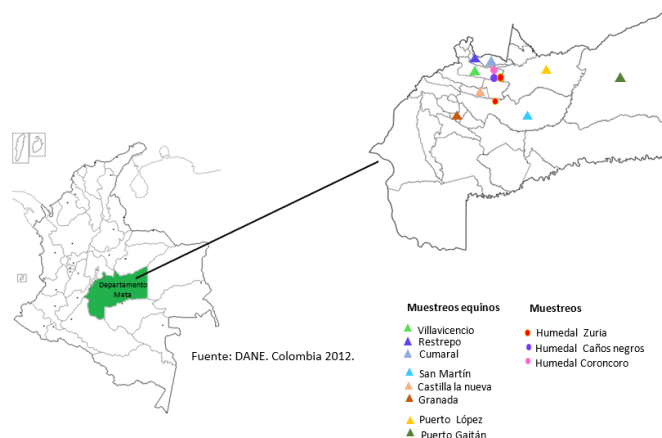


Figura 1. Áreas de muestreo - Vigilancia epidemiológica al virus Occidental del Nilo en departamento del Meta- Colombia

La principal actividad económica de los municipios es la producción agropecuaria, principalmente la actividad ganadera y el cultivo de arroz, con abundantes caños, humedales, morichales (Humedales de los Llanos orientales de Colombia) y esteros en donde habitan una alta variedad de especies silvestres durante gran parte del año. El clima es de bosque húmedo tropical con una altitud entre 200 a 437 msnm., humedad relativa 80% en la época lluviosa (Abril-Noviembre) y de 50% a 60% época seca (Diciembre-Marzo) y precipitación promedio anual entre 2.000 a 3.800 mm.

Selección de la muestra. Se seleccionó una muestra de 613 equinos constituida por animales criollos y cuarto de milla; el cálculo se realizó estimando una prevalencia esperada de 6.7% (17), con una confianza del 95% y una precisión del 2%, según los lineamientos de Peña et al (18) para una población total de 24.480 equinos (19). La edad de los animales se encontraba entre 2 y 15 años.

Obtención de muestras en equinos. Se obtuvo 5.0 mL de sangre de la vena yugular en tubos vacutainer sin anticoagulante (BD), de equinos aparentemente sanos destinados a actividades deportivas y de trabajo y transportados en cadena de frío a 4°C, al laboratorio de Reproducción y Genética Animal de la Universidad de los Llanos. Se centrifugaron a 5000 g por 10 minutos y el suero obtenido se fraccionó en alícuotas de 1.0 ml y conservados a -70°C hasta su análisis.

Elisa y PCR en sueros equinos. Los sueros equinos fueron analizados mediante pools (1

pool < de 10 sueros) utilizando un kit comercial de captura de anticuerpos IgM (ID Screen® West Nile IgM capture. ID VET innovative diagnostics, Montpellier, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los sueros y controles fueron servidos en microplacas de 96 pozos y cubiertos con un anticuerpo IgM antiequino. Las placas fueron lavadas automáticamente (Bioteck Elx50 Instruments Inc, Winooski, VT, USA) con solución de lavado 20X y adicionado el antígeno del virus, seguido de un nuevo lavado y adición de un segundo anticuerpo contra la proteína E del virus marcada con peroxidasa de rábano. Después de un nuevo lavado para eliminar el exceso de conjugado, se adicionó la solución de sustrato TMB y llevado a incubación por 15 minutos en cuarto oscuro. Se adicionó la solución de frenado y posteriormente leídas las placas a una longitud de onda de 450 nm en un lector (EON-Bioteck Instruments Inc, Winooski, VT, USA). Los sueros que presentaron una relación S/P% $\leq 35\%$ se consideraron negativos, entre 35% S/P- 45% S/P dudosos y S/P $\geq 45\%$ positivos. Los sueros con DO ≥ 1.45 se consideraron positivos.

La extracción del ácido nucleico se realizó mediante Trizol LS, (20). La RT-PCR en un paso se realizó mediante el uso del kit One Step RT-PCR (Qiagen®, Valencia, CA), con cebadores universales específicos para flavivirus: FU2 and cFD3, que amplifican un fragmento de 1084 bp de la región del gen NS5 (21). Las condiciones de la RT-PCR fueron: 50°C x 50 min; 95°C x 5 min, 30 ciclos de 94°C x 30 seg, 60°C x 30 seg, 72°C x 1 min y una extensión final de 72°C x 10 min (21). El control negativo usado para la RT-PCR fue agua grado molecular (Gibco®) y el control positivo fue el RNA obtenido de un aislado inactivado del VNO (N° acceso JN716372.1), provisto gentilmente por la Universidad de Wisconsin.

Debido a que no se obtuvieron amplificaciones, no se empleó el protocolo previsto para electroforesis.

Captura, clasificación y PCR en Mosquitos.

Se realizó captura de mosquitos en tres lugares distintos, en el humedal Zuria y Caños negros (Septiembre-Octubre de 2014, transición invierno-verano y Invierno) y el humedal Coroncoro (Invierno Marzo-Abril de 2015). Estos lugares estaban localizados dentro de un radio de 40Km de distancia a Villavicencio, con tal propósito se instalaron dos trampas de luz CDC y 1 Shanon ubicadas a una distancia de veinte metros entre ellas y activadas desde las 18:00 a las 06:00 horas (Figura 1).

Los mosquitos adultos se recolectaron en cajas entomológicas con silica gel, mientras las

formas inmaduras se recolectaron en frascos plásticos con agua de estanques, lagunas, humedales o morichales, cercanos a las áreas de captura de los adultos. Los mosquitos fueron morfológicamente identificados a nivel de especie usando las claves taxonómicas de Lane (22) y Pecor (23), y lo dispuesto en las claves taxonómicas en el WRBI (Walter Reed Biosystematic Unit) (24,25). Una vez clasificados fueron agrupados en pools de acuerdo al sitio de captura, especie y fecha con un máximo de 5 mosquitos por pool y almacenados a -80°C hasta su uso.

A cada mosquito se le retiró el abdomen que fue usado para la extracción de ARN. El pool de mosquitos fue macerado manualmente en 500 μl de PBS. La extracción del ARN se hizo mediante trizol LS. Para la detección molecular del virus, se usó la técnica de RT-PCR con el kit de Qiagen® One-Step RT-PCR, tanto para la transcripción inversa como para la PCR, con los mismos cebadores descritos previamente.

Secuenciación. De manera paralela e independiente a la realización de las RT-PCR, se enviaron las muestras de sueros para secuenciación por método Sanger al Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, siguiendo los protocolos de esta institución. Se intentó obtener la amplificación del gen NS5 usando los cebadores universales para Flavivirus que fueron descritos previamente (21).

Análisis estadístico. Para el análisis de los datos de los mosquitos capturados se usaron los Índices de abundancia proporcional (26), Riqueza, Dominancia (*Índice Simpson*) y Equidad (*Índice Shannon-Wiener*). La comparación del índice de diversidad se realizó mediante la prueba t Students propuesta por Moreno (27).

Los análisis estadísticos para los resultados de laboratorio fueron por métodos descriptivos y se determinaron medidas de tendencia central y dispersión y cálculos de frecuencias.

RESULTADOS

En 613 sueros equinos analizados en 62 pools, no se encontró positividad frente anticuerpos IgM por la técnica de Elisa. De igual forma, los resultados para las pruebas moleculares (RT-PCR) en los mosquitos y en los sueros de equinos también fueron negativos. De la secuenciación Sanger sobre los sueros para el gen NS5 del VNO no se obtuvo información genómica para el virus en los sueros analizados. Respecto a los mosquitos, se capturaron 213 durante 2014 y 222 en el 2015 sin observar diferencias en los índices de diversidad por época de muestreo ($p \geq 0.5$) los que

se clasificaron en 18 especies diferentes. El mayor porcentaje de abundancia durante 2014 fue *Culex quinquefasciatus* 53.5%, *Culex melanoconion* 18.3% y *Coquillettidia Rhynchoetaenia* 13.1%, mientras en 2015 *Culex quinquefasciatus* 27.4%, *Culex nigripalpus* 23.8% y *Culex melanoconion* 10.3%. (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Captura de mosquitos durante 2014 en caños negros y suria de Villavicencio.

Especies	Total	A%	pi	$\lambda = \Sigma pi^2$	H
<i>Culex melanoconion</i>	39	18.3099	0.1831	0.0335	-0.3109
<i>Culex quinquefasciatus</i>	114	53.5211	0.5352	0.2865	-0.3346
<i>Psorophora confinis</i>	8	3.7559	0.0376	0.0014	-0.1233
<i>Psorophora ferox</i>	2	0.9390	0.0094	0.0001	-0.0438
<i>Anopheles darlingi</i>	3	1.4085	0.0141	0.0002	-0.0600
<i>Coquillettidia Rhynchoetaenia</i>	28	13.1455	0.1315	0.0173	-0.2667
<i>Uranotaenia Iowii</i>	9	4.2254	0.0423	0.0018	-0.1337
<i>Uranotaenia sp.</i>	3	1.4085	0.0141	0.0002	-0.0600
<i>Wyeomyia sp.</i>	7	3.2864	0.0329	0.0011	-0.1122
Total Mosquitos	213				

A%=Abundancia (%)

Tabla 2. Captura de mosquitos durante 2015 en el bosque humedal Universidad Cooperativa en Villavicencio.

Especies	Total	A%	Pi	$\lambda = \Sigma pi^2$	H
<i>Aedes howardina</i>	2	0.9009	0.0090	0.0001	-0.0424
<i>Aedes scapularis</i>	4	1.8018	0.0180	0.0003	-0.0724
<i>Aedes taeniorhynchus</i>	2	0.9009	0.0090	0.0001	-0.0424
<i>Anopheles darling</i>	5	2.2523	0.0225	0.0005	-0.0854
<i>Culex melanoconion</i>	23	10.3604	0.1036	0.0107	-0.2349
<i>Culex nigripalpus</i>	53	23.8739	0.2387	0.0570	-0.3420
<i>Culex quinquefasciatus</i>	61	27.4775	0.2748	0.0755	-0.3550
<i>Culicidae spp.</i>	1	0.4505	0.0045	0.0000	-0.0243
<i>Culiseta spp.</i>	2	0.9009	0.0090	0.0001	-0.0424
<i>Psorophora cillianta</i>	19	8.5586	0.0856	0.0073	-0.2104
<i>Psorophora confinis</i>	21	9.4595	0.0946	0.0089	-0.2231
<i>Psorophora ferox</i>	6	2.7027	0.0270	0.0007	-0.0976
<i>Psorophora spp.</i>	8	3.6036	0.0360	0.0013	-0.1198
<i>Shannoniana spp.</i>	1	0.4505	0.0045	0.0000	-0.0243
<i>Uranotaenia sp.</i>	6	2.7027	0.0270	0.0007	-0.0976
<i>Wyeomyia sp.</i>	8	3.6036	0.0360	0.0013	-0.1198
Total Mosquitos	222				

A%= Abundancia %

DISCUSIÓN

La vigilancia epidemiológica al VNO es una actividad de importancia para la salud humana y animal en Colombia, especialmente frente a recientes brotes de otros virus zoonóticos como la Encefalitis Equina del Este y Encefalitis Equina Venezolana en el departamento del Meta en donde se realizó este estudio y del Casanare contiguo a este (28). Los resultados de este estudio, señalan la ausencia de infección puntual reciente en los equinos provenientes de los municipios analizados, adicionalmente es importante indicar que la detección molecular en suero requiere unos niveles de viremia representativos y que el animal se encuentre en la fase aguda de la enfermedad.

Dentro de la respuesta inmune, la IgM es la primera inmunoglobulina que aparece entre los 4-7 días en respuesta a una infección, tiempo del cual surge la IgG, sin embargo en un estudio sobre este virus la IgM pudo persistir por un periodo mayor de 1 año (29) hecho que no fue evidenciado en este estudio a pesar del número de animales analizados. En otra investigación basados en la respuesta de IgG, sugiere limitado valor en el diagnóstico inicial del VNO (30).

Aunque en este estudio no se determinó la presencia de anticuerpos IgG, en razón del uso complementario de las pruebas moleculares en el suero equino y en los mosquitos tendientes a conocer la presencia de circulación viral, es posible que la población equina se mantenga libre de contacto con el virus, tal como fue evidenciado cinco años atrás en animales de la misma región, donde se utilizó la prueba de reducción placa (PRNT), considerada de referencia en el diagnóstico específico de VNO (12). Adicionalmente se sabe que en el ciclo de transmisión y amplificación del virus se requiere de un hospedero aviar que permita el mantenimiento del ciclo (31), por ende, se sugiere estudiar a mayor detalle las especies aviares susceptibles al virus en esta región puesto que esta característica puede ser una de las probables explicaciones de la ausencia de la circulación del virus.

En brotes epidémicos por VNO ocurre una alta tasa de infección entre aves, que transmiten el virus a los mosquitos, los cuales inoculan por picadura el virus a los humanos (32).

Contrariamente en otros lugares de Colombia como la Costa Atlántica (11,33,34) y el departamento de Antioquia (12), se ha reportado la presencia de este virus en equinos y aves (35). Además se confirmó la seroconversión frente a los virus VNO y St. Louis en equinos del departamento de Bolívar (36).

A pesar que este estudio no realizó captura de aves que hiciera posible evidenciar la presencia del virus en esta especie, es posible que este se mantenga en un ciclo enzoótico entre aves virémicas y mosquitos ornitofílicos como ha sido demostrado (37). Sin embargo, en estos municipios no han confluído todas las condiciones epidemiológicas entre ellas climáticas, abundancia de vectores en contacto con aves y humanos y la presencia de aves migratorias infectadas, lo que obliga a realizar nuevos estudios. Se conoce que la prevalencia espacial y temporal del virus depende de factores intrínsecos y extrínsecos entre ellos el hospedero, el vector, la preferencia alimenticia del mosquito, la longevidad del mismo, entre otros, los cuales se conjugan con el clima para condicionar los patrones epidemiológicos de presentación de la infección (38,39).

En el caso particular de los municipios estudiados que se ubican en la zona de los Llanos orientales se ha sugerido una vigilancia especial dada la presencia de aves migratorias y grandes extensiones de agua en ciertas épocas del año entre Mayo y Noviembre (11).

Aunque no fue objeto de este estudio, se plantea que algunas aves migratorias que tienen como ruta de tránsito la región Orinoquia a su paso hacia al sur del continente pueden servir como mecanismo de introducción o diseminación del VNO, esto basado en que luego de la entrada del VNO por primera vez a los EU, se postuló que la rápida diseminación a otras áreas ocurrió a través de las aves migratorias (40).

En Norte América se han identificado 284 especies de aves que han sido infectadas por este virus (41), algunas de las cuales migran hacia el sur de continente encontrándose dentro de esta ruta migratoria, los municipios muestreados en el presente estudio (42). Se puede por tanto hipotetizar que, si este evento ha ocurrido en zonas cercanas a los municipios evaluados en este estudio, es posible que estas aves no hayan tenido contacto con el virus, o que las condiciones locales no favorecieron el ciclo epidemiológico de transmisión, lo que de alguna manera explicaría la ausencia de anticuerpos en equinos o la ausencia del genoma viral en su principal agente amplificador del virus, los mosquitos o en su huésped accidental los equinos. Sin embargo, es importante aclarar que el tamaño de muestra analizado en este estudio no es representativo de la población equina o de mosquitos en la región.

Contrasta estos resultados con un estudio en donde se encontraron equinos seropositivos, pero sin evidencia del virus circulando en pools de 99 especies diferentes de mosquitos

analizados (43). Igualmente con la forma como el virus se ha venido diseminando en otros países de América del sur (9).

Respecto a los mosquitos capturados la mayor frecuencia correspondió al género *Culex*, no obstante, no fue posible evidenciar por PCR el genoma del virus, se conoce que la especie *pipiens* es la mayor trasmisora del virus (44, 45).

La Elisa de captura utilizada en el estudio, es considerada una prueba confiable e indicativa de infección (33), aun así no se observó reactividad serológica frente al virus. Aunque se hubiesen encontrado reactores serológicos se ha sugerido tener una cuidadosa interpretación de los resultados, dada la estrecha relación antigénica con otros flavivirus que pudiesen estar circulando (46,47). En atención a esto, se cree que en las regiones de Colombia en donde el virus es endémico, las pruebas diagnósticas disponibles no han sido las más adecuadas, lo que limita el diagnóstico serológico especialmente donde circulan otros flavivirus (11, 47, 48)

De otro lado, el uso de cebadores universales para flavivirus y no específicos para VNO, no invalida los resultados de este estudio, puesto que lo que se buscaba era su uso como prueba tamiz y el posterior uso de cebadores específicos frente a resultados positivos.

Igualmente, no se tiene una clara explicación frente a los resultados negativos para flavivirus ya que los municipios analizados presentan condiciones ambientales favorables para la circulación de dengue, Zika y Chicungunya u otros flavivirus aún no identificados en la región.

La falta de evidencia de circulación viral obtenida en este estudio no significa que se deba bajar la guardia frente a la vigilancia epidemiológica ya que la transformación ambiental producto de la fragmentación del ecosistema que viene sufriendo la región, motivada por una agricultura empresarial a gran escala, puede generar a futuro nuevos factores de riesgo, entre ellos bióticos y abióticos que podrían favorecer la presentación de brotes epidémicos.

Un ejemplo de esta condición ha sido observada a través de la asociación entre la abundancia del mosquito trasmisor del virus (*Culex pipiens*) y una planta acuática invasora (*Ludwigia grandiflora*) (48). Igualmente, los efectos generados por el cambio climático a nivel mundial podrían ocasionar a futuro una alteración de los patrones del clima y un cambio en la rutas migratorias de las aves, con la aparición de brotes en los equinos y los humanos en lugares nunca imaginados; situación para lo cual el país no está lo suficientemente preparado en términos de infraestructura diagnóstica y mucho menos sobre el conocimiento de esta importante enfermedad.

No menos importancia debe darse a la trasmisión que pudiese existir por acción de los vuelos aéreos que han recortado las distancias entre regiones, países y continentes (48).

La ausencia de evidencia sobre la presencia de este virus obliga a continuar la búsqueda de reactores serológicos en otros municipios de la región de la Orinoquia o en otras regiones del país en donde se viene presentando brotes epidémicos que ocasionan mortalidad en equinos como los virus de la encefalitis equina venezolana y la encefalitis equina del este (28). Aunque recientemente ha surgido la hipótesis de que la ausencia de casos severos en equinos y humanos en Colombia se debe a que el virus circulante es una cepa atenuada similar a la aislada en Texas en 2002 (14).

Finalmente se concluye la ausencia de circulación del VNO en los municipios analizados, lo cual no exime a las autoridades sanitarias del país y centros de investigación para bajar la guardia frente a la vigilancia epidemiológica de este virus.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Agradecimientos

Dirección General de Investigaciones Universidad de los Llanos, Comité de Investigaciones Universidad Cooperativa, Departamento de Patobiología Veterinaria de la Universidad de Wisconsin, por la financiación de este proyecto.

REFERENCIAS

1. Ulbert SW. Nile Virus: The Complex Biology of an Emerging Pathogen. *Intervirology* 2011; 54(4):171–184. <https://doi.org/10.1159/000328320>
2. Diamond MS. Virus and Host Determinants of West Nile Virus Pathogenesis. *Plos Pathogens*. 2009; 5(6):e1000452. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000452>
3. Selisko B, Wang C, Harris E, Canard B. Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. *Curr Opin Virol*. 2014; 9:74–83. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1879625714001916>
4. Montgomery RR, Murray KO. Risk factors for West Nile virus Infection and Disease in Populations and Individuals. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015; 13(3):317–325. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1007043>
5. Angenvoort J, Brault AC, Bowen RA, Groschup MH. West Nile viral infection of equids. *Vet Microbiol*. 2013; 167(1-2):168–180. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.vetmic.2013.08.013>
6. Ward MP, Scheurmann JA: The relationship between equine and human West Nile virus disease occurrence. *Vet Microbiol* 2008; 129(3-4):378–383. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.022>
7. Bielefeldt-Ohmann H, Bosco-Lauth A, Hartwig A-E, Uddin MJ, Barcelon J, Suen WW, et al. Characterization of non-lethal West Nile Virus (WNV) infection in horses: Subclinical pathology and innate immune response. *Microb Pathog*. 2017; 103:71-79. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.018>
8. Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, et al. The Outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City Area in 1999. *N Engl J Med*. 2001; 344:1807-1814. <https://doi.org/10.1056/NEJM200106143442401>
9. Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *BioMed Research International*. 2015; Article ID 376230. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/376230>
10. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(8):1174–1179. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1108.050289b>
11. Mattar S, Edwards E, Laguado J, González M, Alvarez J, Komar N. West Nile virus infection in Colombian horses. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(9):1497-1498. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1109.050426>
12. Góes-Rivillas Y, Taborda N, Díaz F, Góngora A, Rodas JD, Ruiz-Sáenz J, et al. Antibodies to West Nile virus in equines of Antioquia and Meta, Colombia, 2005–2008. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 2010; 23:462–470. <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/rccp/article/view/324610>
13. Osorio J, Ciuderis K, Lopera J, Piedrahita L, Murphy D, Levasseur J. Characterization of West Nile Viruses isolated from captive American flamingoes (*Phoenicopterus ruber*) in Medellín Colombia. *Am J Trop Med Hig*. 2012; 87:565–572. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0655>
14. Hoyos R, Uribe S, Gallego JC. Evolutionary relationships of West Nile virus detected in mosquitoes from a migratory bird zone of Colombian Caribbean. *Virology*. 2015; 12(80):1-6. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0310-8>
15. Rey P. Virus del Oeste del Nilo: Un patógeno de importancia para Colombia. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional- IQEN 2013; 18(20):206–221. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/IQEN/IQEN%20vol%2018%202013%20num%2020.pdf>
16. Díaz LA, Komar N, Visintin A, Dantur MJ, Stein M, Aguilar J, et al. West Nile Virus in Birds, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(4): 689-691. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071257>
17. Naing L, Winn T, Rusli BN. Practical issues in calculating the sample size for prevalence studies. *Arch Orofacial Sci*. 2006; 1:9-14. http://aos.usm.my/docs/Vol_1/09_14_ayub.pdf

18. Peña J, Berrocal L, González M, Ponce C, Ariza K, Máttar S. Virus del oeste del Nilo. Perspectivas en el mundo vertebrado. *Rev MVZ Córdoba*. 2005; 10(2):583-601. <https://doi.org/10.21897/rmvz.463>
19. ICA. Censo Pecuario Nacional 2016. Colombia: Instituto Colombiano Agropecuario – ICA; 2016. <http://www.ica.gov.co/getdoc/8232c0e5-be97-42bd-b07b-9cdbfb07fcac/Censos-2008.aspx>
20. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem*. 1987; 162 (1):156-159. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440339>
21. Kuno G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J Virol Methods*. 1998; 72(1):27-41. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(98\)00003-2](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00003-2)
22. Olano V, Tinker M. Fauna de mosquitos asociada con aedes aegypti en Guaduas, Colombia. *Biomédica*. 1993; 1(2):71-74. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v13i2.2048>
23. Pecor J, Mallanpalli V, Harbach R, Peyton E. Catalog and illustrated review of the subgenus *Melanoconion* of *Culex* (Diptera: Culicidae). *Contrib Am Entomol Inst*. 1992; 27(2):1-228. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Pecor%20et%20al%201992.pdf>
24. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41:95–98. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
25. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res*; 2003; 31(13):3497-500. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg500>
26. Peet RK. The Measurement of Species Diversity. *Ann Rev Ecol Syst*. 1974; 5:285-307. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.05.110174.001441>
27. Moreno CE. Métodos para medir la biodiversidad. *M&T Manuales y Tesis SEA: España*; 2001. <http://entomologia.rediris.es/sea/manytes/metodos.pdf>
28. ICA. Boletín epidemiológico. Resultados de vigilancia II semestre. ICA: Boyacá, Colombia; 2016. https://www.ica.gov.co/areas/agricola/servicios/epidemiologia-agricola/boletines_pnmf/2016/boyaca_semestre2.aspx
29. Roehrig JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS, Campbell GL: Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed west nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(3):376-379. <https://doi.org/10.3201/eid0903.020531>
30. Tardei G, Ruta S, Chitu V, Rossi C, Tsai TF, Cernescu C: Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(6):2232-2239. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10834982>
31. Pérez-Ramírez E, Llorente F, MA. Experimental Infections of Wild Birds with West Nile Virus. *Viruses*. 2014; 6(2):752–781. <https://doi.org/10.3390/v6020752>
32. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5(5):643–650. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990505>
33. Berrocal L, Peña J, González M, Mattar S. Virus del Oeste del Nilo: Ecología y epidemiología de un patógeno emergente en Colombia. *Rev Salud Pública*. 2006; 8(2):218-228. <https://www.scielosp.org/article/rsap/2006.v8n2/218-228/>
34. Mattar S, Komar N, Young G, Alvarez J, Gonzalez M. Seroconversion for West Nile and St. Louis encephalitis viruses among sentinel horses in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106(8):976-979. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000800012>
35. Beck C, Jimenez-Clavero MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparc-Goffart I, et al. Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10(11):6049-83. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph10116049>

36. Kramer LD, Bernard KA. West Nile virus in the Western Hemisphere. *Curr Opin Infect Dis.* 2001; 14(5):519–525. <https://doi.org/10.1097/00001432-200110000-00004>
37. Hernández R, Bravo L, Morón R, Armas A, Girón B, Aponte T. El Virus del Nilo Occidental. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.* 2009; 40(1):44-56. <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0798-04772009000100007>
38. OPS/OMS. Encefalitis Equinas transmitidas por artrópodos. *Boletín Salud Pública Veterinaria. Organización Panamericana de la Salud. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.* 2013. https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=zoonosis-779&alias=57-encefalitis-equinas-transmitidas-por-artropodos-7&Itemid=518
39. Ciota AT, Kramer LD. Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus. *Viruses.* 2013, 5(12):3021-3047. <https://doi.org/10.3390/v5123021>
40. Rappole JH, Hubálek Z. Migratory birds and West Nile virus. *J Applied Microbiol.* 2003, 94:47S–58S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.6.x>
41. Hayes EB, Komar N, Roger S, Nasci RS, Montgomery SP, O’Leary DR, et al. Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(8):1167–1173. <https://doi.org/10.3201/eid1108.050289a>
42. Ciuderis-Aponte KA. Virus del oeste del nilo (VON): Enfermedad zoonótica emergente de posible importancia en Colombia. *Orinoquia.* 2009; 13(1):46-58. <https://orinoquia.unillanos.edu.co/index.php/orinoquia/article/view/235>
43. Jaramillo M, Peña J, Berrocal L, Mattar S, González M, Komar N, et al. Vigilancia centinela para el virus del Oeste del Nilo en culícidos y aves domésticas en el Departamento de Córdoba. *Rev MVZ Córdoba.* 2005; 10(2):633-638. <https://doi.org/10.21897/rmvz.467>
44. Fros JJ, Geertsema C, Vogel’s CB, Roosjen PP, Failloux AB, Vlak JM, et al. North-Western European Mosquitoes Indicates Its Epidemic Potential and Warrants Increased Surveillance. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 9(7):e0003956. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003956>
45. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2(9):519–529. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12206968>
46. Joó K, Bakonyi T, Szenci O, Sárdi S, Ferenczi E, Barna M. et al. Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in equine serum after natural infection or vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 2017; 183:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.015>
47. Alarcón-Elbal PM, Sánchez JM, Delacour S, Ruiz I, Pinal R, Lucientes J. Asociación de vector del VNO e hidrófito invasor: *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 y *Ludwigia grandiflora* (Michaux) Greuter & Burdet en el marjal de Xeraco-Xeresa, Valencia. *Anales de Biología.* 2013; 35:17-27. <http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.0.35.4>
48. OPS/OMS. La mitad de la población de las Américas, en riesgo de contraer enfermedades transmitidas por pequeños insectos. La Paz, Bolivia: Organización Panamericana de la Salud; 2014. https://www.paho.org/bol/index.php?option=com_content&view=article&id=1621:la-mitad-poblacion-americas-riesgo-contraer-enfermedades-transmitidas-pequenos-insectos&Itemid=481