

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Estudio serológico en localidades cubanas con infecciones confirmadas al virus del Nilo Occidental

*Dra. C. Maritza Pupo-Antúnez,<sup>1</sup> Dra. C. Victoria Cabrera Rodríguez,<sup>2</sup> MSc. Yaimée Vázquez Mojena,<sup>1</sup> PhD. Mike Drebot,<sup>3</sup> PhD. Maya Andonova,<sup>3</sup> MSc. Félix Dickinson Meneses,<sup>1</sup> MSc. Omar Fuentes González,<sup>1</sup> MSc. Antonio Pérez Rodríguez,<sup>1</sup> Dr. Paulino Santos Montero<sup>4</sup>*

### RESUMEN

**Introducción:** las primeras infecciones por el virus del Nilo Occidental en Cuba se reportaron en 2004. **Objetivo:** monitorear y conocer la prevalencia del virus del Nilo Occidental en áreas con casos confirmados de este. **Métodos:** el estudio se llevó a cabo en la municipalidad de Jatibonico y en la ciudad de Sancti Spiritus. Un total de 14 personas, 8 caballos y 41 aves se estudiaron para la detección de anticuerpos a flavivirus y específicos al virus del Nilo Occidental. **Resultados:** se confirmó la presencia de anticuerpos específicos a virus del Nilo Occidental en 4 muestras de suero de aves y 4 de caballos. Una persona se confirmó como 1 caso de infección por virus del Nilo Occidental asintomático. **Conclusiones:** la presencia de anticuerpos específicos al virus del Nilo Occidental en aves residentes, caballos y humanos en áreas con casos confirmados demuestran el establecimiento de un ciclo de amplificación local establecido en Cuba antes de este estudio.

**Palabras clave:** serología, humanos, caballos, aves, infección por Virus del Nilo Occidental.

---

### INTRODUCCIÓN

El virus del Nilo Occidental (VNO) pertenece a la familia Flaviviridae y es similar a otros flavivirus transmitidos por artrópodos causantes de encefalitis como el virus de la encefalitis de San Luis (VESL), encefalitis japonesa y el virus del valle de Murray. El VNO es transmitido por mosquitos hembra, usualmente del género *Culex*, que infecta aves, equinos y humanos. Su expansión ha ocurrido rápido a través de EE. UU. y Canadá,<sup>1</sup> y desde estos a diferentes países de América y el Caribe.<sup>2</sup> La vigilancia epidemiológica en aves y equinos ha demostrado su amplia circulación en México, el Caribe, Centro América y Sur América.<sup>3,4,5-13</sup>

La mayoría de los aislamientos virales han sido a partir de mosquitos, aves y mamíferos<sup>14</sup> y la minoría a partir de muestras humanas. Es por ello que las pruebas serológicas en el diagnóstico del VNO en humanos ha sido la clave para documentar la exposición en estas regiones y generar información adicional sobre la emergencia y expansión del VNO en América Latina y el Caribe.<sup>4,13-16</sup>

### MÉTODOS

El estudio fue conducido en la municipalidad de Jatibonico y en la Ciudad de Santi Spiritus. En estas, habían sido confirmado dos casos y uno

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Centro Provincial de Higiene y Epidemiología. Sancti Spiritus, Cuba.

<sup>3</sup> National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada. Winnipeg, Canada.

<sup>4</sup> Instituto de Medicina Veterinaria. La Habana, Cuba.

diagnosticado como sospechoso durante la vigilancia del VNO en 2003 y 2004, respectivamente.<sup>13</sup> Se estudiaron 11 personas, 8 caballos y 41 aves relacionados con ambos casos confirmados, así como 2 personas asociadas al caso sospechoso de infección al VNO. Ninguno de ellos presentó síntomas clínicos antes el estudio o durante este.

#### DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGG ESPECÍFICOS AL VNO Y AL VIRUS DENGUE (DEN) EN MUESTRAS HUMANAS

Los sueros humanos se estudiaron para la determinación de anticuerpos IgM e IgG al VNO, mediante un juego diagnóstico comercial (*Focus Technologies, Cypress, CA, USA*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. También se estudiaron para anticuerpos IgG específicos a Den por el método de ELISA de inhibición (MEI) previamente descrito.<sup>17</sup>

El juego comercial *Focus Diagnostics IgM captura Dx Select™* e IgG está basado en microplacas de poliestireno recubiertas con anti IgM humano (*chain  $\mu$* ) específica para la captura de la IgM a partir de las muestras. En este, se utiliza un antígeno recombinante del VNO y un conjugado compuesto por un anticuerpo monoclonal anti-flavivirus conjugado con peroxidasa. El valor índice (VI) es el resultado de la densidad óptica (DO) de la muestra dividida por la DO de los calibradores. Valores mayores que 1,10 son considerados positivos.

En la detección de anticuerpos IgG a Den las placas de poliestireno (Costar No. 3591) fueron adsorbidas con IgG humana anti-dengue; después del bloqueo, se añadió el antígeno de Den 2 previamente diluido 1/40 en tampón fosfato (PBS) y Tween-20 0,05 % a cada pozo. Posteriormente se añadieron 100  $\mu$ L de la muestra de suero diluida 1/20, seguido tras la incubación de la adición del conjugado de IgG humana anti-dengue peroxidasa 1/3000 en PBS-Tween 20 0,05 % y 2 % de suero fetal bovino. La ortofenilendiamina (OPD) y el peróxido de hidrógeno se agregaron como sustrato. La reacción se detuvo tras 30 min de incubación y la lectura se realizó a 492 nm. Las muestras con un porcentaje de inhibición mayor o igual que 50 se consideraron positivas.

#### DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-FLAVIVIRUS Y ANTI-VNO EN CABALLOS Y AVES. ELISA DE BLOQUEO (C-ELISA)

Las muestras de suero de caballos y aves se estudiaron por c-ELISA utilizando los anticuerpos monoclonales anti-flavivirus y anti-VNO 6B6C-1 y 3.1112G, respectivamente.<sup>3</sup>

En la detección de anticuerpos en muestras de caballos, se recubrieron placas de 96 pozos (Costar) con un antígeno semipurificado de VNO (amablemente donado por el doctor JF Contreras de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México) a una dilución de 1:100 en PBS e incubadas a 4 °C durante toda la noche. Se siguió el mismo protocolo al estudiar las muestras de aves, pero en este caso se utilizó el antígeno de VNO a partir de cerebro de ratones lactantes (atentamente ofrecido por *NML. Health Canada*).

Después del bloqueo se adicionaron las muestras a una dilución 1:10 y se incubaron durante 2 h. Como conjugado se utilizó el AcM 6B6 conjugado con peroxidasa diluido 1:3 000. y la OPD y peróxido de hidrógeno como sustrato. La reacción fue detenida con la adición de 12,5 %  $H_2SO_4$  y se leyó la absorbancia a 492 nm. Los valores de inhibición mayores que 30 % se consideraron como criterio diagnóstico para identificar anticuerpos anti-flavivirus.

Todas las muestras reactivas se estudiaron en un formato similar usando el AcM específico a VNO 3.1112G y un conjugado anti-ratón peroxidasa (Amersham).

Los sueros humanos, de caballos y aves positivas a IgG al VNO se probaron mediante el ensayo de neutralización por reducción del número de placas (NRNP).

#### NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DEL NÚMERO DE PLACAS (NRNP)

La NRNP fue desarrollada para confirmar la presencia de anticuerpos específicos al VNO usando el procedimiento de la doble capa con rojo neutro (18) y las cepas (NY99, Ontario, Canada, 2001), SLEV (*Parton strain, American Type Culture Collection* catalog No. (VR-1265) y Den (dengue 2, cepa NG-C). Las muestras se consideraron positivas a un flavivirus particular si el título a 90 %

NRNP resultó 4 veces mayor que el título neutralizante para cualquiera de los otros aplicados en el estudio. La titulación a punto final fue definida como la mayor dilución del suero que redujo la formación de placas mayor que 90 %.

#### INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (IH)

La IH con los virus VNO y VESL se realizó según describieron previamente *Clark y Casals*.<sup>19</sup> El antígeno de VNO (NY99) y VESL (Parton) fueron donados solícitamente por el Laboratorio Nacional de Microbiología NML, Health Canada.

#### RESULTADOS

A los flavivirus probados mostraron anticuerpos IgG, 7 individuos epidemiológicamente relacionados o que residían en áreas cercanas a los casos confirmados al VNO. Uno de ellos presentó anticuerpos neutralizantes a VESL y uno al virus Den. Ninguno fue positivo al VNO por el ensayo de neutralización y no reportaron ningún signo de la enfermedad en el momento de la toma de muestra. Una persona, asociada al caso sospechoso de VNO, fue positiva a anticuerpos específicos a este virus en el ensayo.

El 75 % de los caballos pertenecientes a uno de los casos confirmados presentaron anticuerpos al VESL y al VNO en el c-ELISA y en la IH, de ellos 4 resultaron positivos frente al VNO. De igual forma ningún caballo mostró signos de la enfermedad al tiempo de la toma de muestra. En la tabla 1 se muestran los resultados serológicos en las muestras de caballos.

**Tabla 1.** Resultados de los ensayos serológicos en sueros de caballos

Localidad No.	c-ELISA inhibición %		NRNP 90 %		IH		Interpretación
	Anti-flavivirus	Anti-VNO	VNO	ESL	VNO	ESL	
J 10	85,7	68	20	-	80	40	VNO
J 11	-	-	-	-	< 20	20	Negativo
J 12	88,5	52,5	>80	-	20	40	VNO
J 13	92,15	-	MS	30	40	160	Probable VESL
J 14	60,7	-	40	10	< 20	40	VNO
J 15	71,1	-	-	-	< 20	< 20	Anticuerpos a flavivirus
J 16	65,8	40	40	14	40	80	VNO
J 17	-	-	-	-	20	40	Negativo

NRNP: neutralización por reducción del número de placas, VNO: virus del Nilo Occidental, IH: virus del Nilo Occidental, ESL: encefalitis de San Luis, MS: muestra insuficiente, c-ELISA: valores de inhibición mayores que 30 % se consideraron como criterio de positividad.

De las 41 aves estudiadas solo 4 fueron positivas a flavivirus, 3 de las cuales tuvieron anticuerpos neutralizantes al VNO. En la tabla 2 se resumen los resultados de estos ensayos.

**Tabla 2.** Resultados serológicos de las aves estudiadas

LocalidadNo. Jatibonico	c-ELISA% inhibición		Interpretación
	Anti-flavivirus	Anti- VNO	
1	84,6	61,9	VNO
4	83,8	53,6	VNO
11	66,7	20	Anticuerpos a flavivirus
Pn 1	90,3	42,5	VNO

VNO: virus del Nilo Occidental, c-ELISA: valores de inhibición mayores que 30 % se consideraron como criterio de positividad.

#### DISCUSIÓN

El primer caso humano y equino de infección al VNO en Cuba fue reportado en 2005.<sup>13</sup> Un modo potencial de introducción del VNO en Cuba pudo ser a través de aves migratorias infectadas. De hecho, muchas especies de ellas migran desde la costa de EE. UU. hacia el Caribe;<sup>20,21</sup> no obstante, la verdadera forma de introducción se desconoce.

La vigilancia del VNO en aves fue implementada en Cuba a partir de 2002 hasta 2003 y ninguna muestra de ave fue positiva al VNO. En 2003 se confirmó serológicamente el primer caso humano de infección por VNO, motivo por el cual la vigilancia en aves se interrumpió. Estos resultados sugirieron la introducción del VNO en Cuba anterior a esta fecha.

Los resultados actuales demuestran la presencia de anticuerpos en aves y equinos relacionados con los primeros casos de infección al VNO,

que confirman el establecimiento de un ciclo de amplificación zoonótica desde aves residentes a equinos y al hombre, entre 2002 y 2003. A pesar de que en este trabajo no fue incluido un estudio entomológico la presencia en estas áreas del vector ha sido documentada.<sup>22</sup> Diferentes especies de mosquitos *Culex* se han identificado en Jatibonico, específicamente *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus* y también *Ochlerotatus taeniorhynchus*, lo cual indica su posible papel amplificador y(o) de vector puente.

#### SEROLOGICAL STUDY CARRIED OUT IN CUBAN LOCALITIES WHERE CONFIRMED WESTERN NILE VIRUS INFECTION IS PRESENT

##### ABSTRACT

**Introduction:** first infected cases caused by West Nile virus were reported in Cuba in 2004. **Objective:** to monitor and learn about the prevalence of the West Nile virus in those areas with confirmed cases. **Methods:** the study was conducted in *Jatibonico* municipality and in the city of *Sancti Spiritus*. A total number of 14 persons, 8 horses and 41 birds were researched to detect antibodies to flavivirus and specific antibodies to West Nile virus. **Results:** the presence of specific antibodies to West Nile virus was confirmed in 4 samples of sera from birds and in 4 from horses. One person was confirmed as one case of asymptomatic West Nile virus infection. **Conclusions:** the presence of specific antibodies to West Nile virus in birds, horses and persons residing in areas where there are confirmed cases showed that a local amplification cycle had been established in Cuba before this study.

**Key words:** serology, humans, horses, birds, West Nile virus infection.

##### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gubler D. The Continuing Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere Clinical. *Infectious Diseases*. 2007;45:1039-46.
- Artsob H, Gubler D, Enria D, Morales M, Pupo M, Bunning M, et al. West Nile virus in the new world: Continuing Spread and Proliferation of a Globally- Distributed Invasive Emerging Pathogen. *Zoonoses Public Health*. 2009;56:357-69.
- Blitvich B, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero J, Marlenee N, Gonzalez-Rojas J, Komar N, et al. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:853-6.
- Dupuis A, Marra P, Kramer L. Serologic evidence of West Nile virus transmission, Jamaica, West Indies. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:860-3.
- Estrada-Franco J, Navarro-Lopez R, Beasley D, Coffey L, Carrara A, Rosa AT, et al. West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:1604-7.
- Komar N. West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res*. 2003;61:185-234.
- Loroño-Pino M, Blitvich B, Farfan-Ale J, Puerto F, Blanco J, Marlenee N, et al. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:857-9.
- Quirin R, Salas M, Zientara S, Zeller H, Labie J, Murri S, et al. West Nile virus, Guadeloupe. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:706-8.
- Lefrancois T, Blitvich B, Pradel J, Molia S, Vachery N, Martinez D. West Nile Virus in Guadeloupe Introduction, Spread, and Decrease in Circulation Level: 2002-2005. *Ann NY Acad.Sci*. 2006;1081:206-15.
- Mattar S, Edwards E, Laguado J, Gonzalez M, Alvarez J, Komar N. West Nile virus antibodies in Colombian horses. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:1497-8.
- Morales M, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia J, Vissani A, Trono K, et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1559-61.
- Bosch I, Herrera F, Navarro J, Lentino M, Dupuis A, Maffei J, et al. West Nile virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(4):651-3.
- Pupo M, Guzmán M, Fernandez R, Llop A, Dickinson F, et al. West Nile Virus Infection in Humans and Horses, Cuba. *Emerg Infect Diseases*. 2006;12(6):1022-4.
- Komar N, Clark G. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publ*. 2006;19(2):112-7.
- Barrera R, Hunsperger E, Muñoz-Jordán J, Amador M, Diaz A, Smith J, et al. Short Report: First Isolation of West Nile Virus in the Caribbean. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78(4):666-8.
- Blitvich B. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Animal Health Research Reviews*; 2008. p. 1-16.
- Vazquez S, Valdes O, Pupo M, Delgado I, Alvarez M, Pelegrino JL. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods*. 2003;110(2):179-84.
- Beaty B, Calisher C, Shope R. Arboviruses. In: Schmidt NJ, Emmons RW, editors. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 6th ed. Washington: American Public Health Association; 1989. p. 797-856.
- Clarke D, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropodborne viruses. *Amer J Trop Med Hyg*. 1958;7:561-73.
- Rappole J, Derrickson S, Hubalek Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis*. 2000;6(319-328).
- Peterson AT, Martinez-Campos C, Nakazawa Y, Martinez-Meyer E. Time-specific ecological niche modeling predicts spatial dynamics of vector insects and human dengue cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005;99(9):647-55.
- Cruz C, Cabrera M. Caracterización entomológica-ecológica de casos y sospechosos del virus del Nilo Occidental en la provincia Sancti Spiritus, Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2006;58(3):235-40.

Recibido: 2 de junio de 2011. Aprobado: 8 de julio de 2011.

Maritza Pupo-Antúnez. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía. Km 6 ½. Lisa, La Habana, Cuba. Teléf.: 53-7-20223507. Fax: 53-7-2046051. Correos electrónicos: mpupo@ipk.sld.cu; yaimeev@ipk.sld.cu; Mike.Drebot@phac-aspc.gc.ca; Maya.Andonova@phac-aspc.gc.ca; dickinson@ipk.sld.cu; omar@ipk.sld.cu; antonio@ipk.sld.cu; pssantos@infomed.sld.cu