

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN DOS LOCALIDADES CON
ANTECEDENTES DE ENFERMEDAD NEUROLÓGICA EN EQUINOS:
DETERMINACIÓN MOLECULAR EN AVES Y MOSQUITOS Y SEROLOGÍA EN
HUMANOS, AVES Y EQUINOS

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado
en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar al grado y título
de Maestría Académica en Microbiología con énfasis en Virología

MARÍA MARTA PICHE OVARES

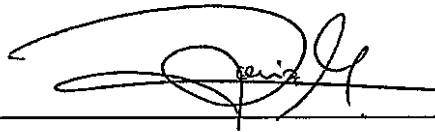
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2019

Dedicatoria y agradecimientos

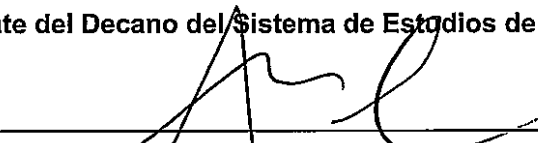
Este trabajo se lo dedico a mis papás, mi hermano Gabriel y mi esposo Alejandro que me han apoyado incondicionalmente durante este proceso.

Esta tesis fue aceptada por la comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología con énfasis en Virología”



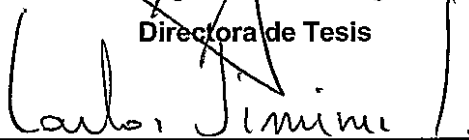
PhD. Gilbert David Loria Masis

Representante del Decano del Sistema de Estudios de Posgrado



PhD. Eugenia Corrales Aguilar

Directora de Tesis



PhD. Carlos Jiménez Sánchez

Asesor



PhD. Andrés Moreira Soto

Asesor



PhD. Lizbeth Ramírez Carvajal

Representante

Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología



María Marta Piche Ovares

Candidata

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA	I
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	II
HOJA DE APROBACIÓN	IV
TABLA DE CONTENIDOS	IV
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE CUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
1. ANTECEDENTES	1
1.1. GENERALIDADES DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO.....	1
1.2. ORIGEN DE LA ENFERMEDAD E INTRODUCCIÓN A AMÉRICA.....	2
1.3. CICLOS ENZOÓTICOS Y EPIZOÓTICOS.....	3
1.4. SITUACIÓN DEL WNV EN COSTA RICA.....	7
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. HIPÓTESIS	11
4. OBJETIVOS	12
4.1. OBJETIVO GENERAL	12
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1. SITIOS DE MUESTREO	13
5.2. CAPTURA Y CLASIFICACIÓN DE AVES Y MOSQUITOS	15
5.3. TOMA DE MUESTRAS PARA LOS DIFERENTES ANÁLISIS	16
5.4. LÍNEAS CELULARES Y CEPAS VIRALES UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS SEROLÓGICOS DE PRNT	17
5.5. ANÁLISIS SEROLÓGICOS: DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA CONTRA WNV EN SUEROS DE AVES, EQUINOS Y SERES HUMANOS MEDIANTE ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DE PLACAS (PRNT).....	20

5.6.	RT-PCR PARA EVALUAR LA PRESENCIA DE ARN DE FLAVIVIRUS EN MUESTRAS DE AVES Y MOSQUITOS.....	23
5.7.	DETERMINACIÓN DE PREFERENCIAS DE ALIMENTACIÓN EN HEMBRAS GRÁVIDAS POR MEDIO DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD 1 (COI).....	27
5.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
6.	RESULTADOS.....	29
6.1.	NUMEROSAS MUESTRAS DE AVES, EQUINOS, MOSQUITOS Y SERES HUMANOS FUERON RECOLECTADAS EN LAS 8 UNIDADES HABITACIONALES EN LOS DOS SITIOS QUE SE UTILIZARON PARA LOS ANÁLISIS.	29
6.2.	UN TOTAL DE 140 AVES Y 1373 MOSQUITOS SE COLECTARON Y FUERON CLASIFICADOS POR ESPECIE.....	33
6.3.	EVIDENCIA SEROLÓGICA DE INFECCIÓN PREVIA CON WNV EN EQUINOS, AVES Y SERES HUMANOS.	42
6.4.	NO SE EVIDENCIÓ INFECCIÓN ACTIVA POR WNV EN AVES Y MOSQUITOS POR MEDIO DE DETECCIÓN DEL ARN VIRAL EN LAS MUESTRAS.....	53
6.5.	LA DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE ALIMENTACIÓN EN MOSQUITOS EVIDENCIÓ LA GRAN VARIEDAD DE FUENTES DE SANGRE	55
6.6.	EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO MUESTRA UNA CORRELACIÓN ENTRE LA EDAD Y LA POSITIVIDAD A FLAVIVIRUS.....	56
7.	DISCUSIÓN.....	59
7.1.	EN LA ZONA DE CUAJINIQUIL EXISTE EVIDENCIA SEROLÓGICA DE CIRCULACIÓN DE WNV.	59
7.2.	POR MEDIO DE RT-PCR NO SE PUDO DEMOSTRAR NINGUNA INFECCIÓN ACTIVA POR WNV EN AVES Y MOSQUITOS	61
7.3.	LA MAYORÍA DE LOS MOSQUITOS RECOLECTADOS PERTENECIAN AL GÉNERO <i>CULEX</i>	61
7.4.	EN LA ZONA DE TALAMANCA SE ENCONTRÓ EVIDENCIA DE CIRCULACIÓN DE SLEV.....	62
7.5.	EXISTE EVIDENCIA CIRCULACIÓN ACTIVA DE VARIOS FLAVIVIRUS EN LA ZONA DE CUAJINIQUIL.	63
7.6.	SE REQUIERE EDUCAR A LA POBLACIÓN EN MEDIDAS DE PREVENCIÓN PARA EVITAR LA PICADURA JDE MOSQUITOS.	65
7.7.	SE REQUIERE DE LA INTEGRACIÓN DE LOS SECTORES DE SALUD HUMANA Y ANIMAL PARA TRABAJAR EN CONJUNTO LA PREVENCIÓN Y VIGILANCIA DE ESTOS VIRUS.	65
8.	CONCLUSIONES.....	67
9.	RECOMENDACIONES	68
10.	CONDICIONES ÉTICAS Y DE FINANCIAMIENTO	69
11.	REFERENCIAS.....	70

12. ANEXOS.....	81
-----------------	----

Resumen

El virus de Oeste del Nilo (WNV por sus siglas en inglés) es un miembro de la familia *Flaviviridae*. Su ciclo natural involucra la transmisión entre aves y mosquitos. Las aves son los hospederos y diseminadores del patógeno (reservorios). Éstas presentan viremias altas lo que permite que sea transmitido a los mosquitos, especialmente a los del género *Culex*. Ocasionalmente, se presentan brotes en seres humanos y equinos (hospederos accidentales) causando desde cuadros leves (dolor de cabeza y fiebre) hasta cuadros más graves, los cuales presentan sintomatología nerviosa y pueden ser fatales.

En este estudio se realizó un análisis exhaustivo de los posibles involucrados tanto en el ciclo enzoótico como epizoótico, detectando molecularmente (RT-PCR) la presencia del virus en mosquitos y aves; y serológicamente (PRNT) la presencia de anticuerpos neutralizantes en aves, seres humanos y equinos en dos zonas con antecedentes de enfermedad neurológica equina en Costa Rica. Las muestras se tomaron en época seca y lluviosa para evidenciar eventos de seroconversión.

La primera zona fue Cuajiniquil, en esta localidad se analizaron un total de 86 sueros de equino y 16 sueros de seres humanos en la época lluviosa. En la época seca, se obtuvo una muestra pareada respecto al primer muestreo de 57 sueros de equinos y 12 humanos. Asimismo, se obtuvo un total de 49 sueros de aves silvestres y 32 sueros de gallinas domésticas. Además, se analizaron 52 muestras de tejidos de aves y 554 mosquitos agrupados en 163 pooles y 12 hembras grávidas. Las muestras fueron colectadas entre julio 2017-abril 2018. Los resultados muestran que 21 (24.42%) de los equinos, 1 (5.2%) de los humanos, 1 (2.04%) ave silvestre y 1 (3.13%) gallina doméstica presentaron anticuerpos neutralizantes contra WNV. Además, un equino que resultó negativo en la primera muestra presentó altos títulos en el segundo muestreo, evidenciando un evento de seroconversión. En esta zona no se detectó molecularmente el virus en ninguna de las muestras colectadas.

Este resultado contrasta con la zona de Talamanca donde no se logró obtener evidencia ni serológica ni molecular de la circulación de WNV, pero sí se evidenció la presencia del virus de SLEV (Saint Louis Encephalitis virus), otro miembro de la familia de los Flavivirus que presenta un ciclo de trasmisión similar al de WNV. Las muestras para esta zona fueron colectadas entre julio – noviembre 2018. Un total de 20 sueros equinos, 17 de seres humanos (16 equinos y 15 seres humanos con muestra pareada), 79 sueros de aves silvestres y 7 sueros de gallinas domésticas fueron colectados. Además, molecularmente se analizaron 88 aves silvestres, 819 mosquitos agrupados en 199 pooles y 22 hembras grávidas. Tanto en seres humanos (n=2, 11.76%), equinos (n=1, 5%) y aves silvestres (n=2, 2.5%) se encontró evidencia serológica de una infección previa con SLEV.

Los hallazgos de este trabajo evidencian la circulación de WNV en el área de Cuajiniquil y de SLEV en el área de Talamanca. Este es el primer estudio exhaustivo que reporta la presencia de anticuerpos neutralizantes contra SLEV y WNV en seres humanos, equinos y aves en Costa Rica, lo que indica que existe circulación de estos virus en las zonas de estudio. Esta información reafirma la dificultad del diagnóstico de enfermedades febriles en humanos y animales cuando no se cuenta con información epidemiológica de los virus que circulan en el país, e insta a las autoridades de salud a tomar acciones provisionarias y de control ante posibles brotes de estos dos virus. Además, reafirma la importancia de una asertiva comunicación entre los sectores veterinarios y de salud humana en el contexto de “Una Salud” de manera que permita tomar acciones conjuntas.

Abstract

West Nile Virus (WNV) is a member of the *Flaviviridae* family. Its natural cycle involves transmission between birds and mosquitoes. Birds are the natural host and amplifiers of this virus (reservoirs). They present high levels of viremia, this allows the transmission to mosquitoes, especially those of the genus *Culex*. Sporadically, outbreaks occur in humans and equines (dead-end hosts) which may result in mild illness (headache and fever) to more severe illnesses with central nervous system symptoms that could lead to death.

In this study, we analyze the possible actors involved in both the enzootic and epizootic cycles, detecting with molecular methods (RT-PCR) the presence of the virus in mosquitoes and birds and with serological methods (PRNT) the presence of neutralizing antibodies in birds, humans and horses in two areas with a previous history of equine neurological disease from Costa Rica. Samples were taken during dry and rainy seasons to evidence putative seroconversion events.

The first area sampled was Cuajiniquíl, here a total of 86 equine and 16 human sera were analyzed during the rainy season. During the dry season, a paired sample was obtained from 57 equines and 12 humans. A total of 49 wild bird sera and 32 domestic chicken sera were also obtained. In addition, 52 samples of bird tissue and 554 mosquitoes were analyzed, the later grouped into 163 pools and 12 gravid females. Samples were collected between July 2017-April 2018. Results showed that 21 (24.42%) of equines, 1 (5.2%) of humans, 1 (2.04%) wild bird and 1 (3.13%) chicken presented neutralization antibodies unequivocally against WNV. Also, an equine that tested negative in the first sample featured high titers in the second, showing a seroconversion event. In this area, the virus was not detected by RT-PCR in any of the collected samples.

These results contrast with the area of Talamanca where no evidence was obtained either serologically or molecularly of the circulation of WNV, but the presence of SLEV (Saint Louis Encephalitis virus), another member of the Flavivirus family which its natural cycle is similar to WNV, was found. Samples for this area were collected between July-November 2018. A total of 20 equine and 17 human sera (with 16 equine and 15 humans with paired samples), 79 wild bird sera and 7 chicken sera were collected. In addition, 88 wild birds and 819 mosquitoes grouped in 199 pools and 22 gravid females were analyzed by RT-PCR. Samples of humans (n=2, 11.76%), equines (n=1, 5%) and wild birds (n=2, 2.5%) with unequivocally serological evidence of a previous SLEV infection were found.

The findings of this work show the circulation of WNV in Cuajiniquíl and SLEV in Talamanca areas. This is the first comprehensive study that conclusively and unequivocally reports the presence of neutralizing antibodies against SLEV and WNV in Costa Rica, indicating that there is circulation of these viruses in the study area. This information reaffirms the difficulty of the correct diagnostics of febrile diseases in humans and animals, when epidemiological information is not available for other viruses circulating in the country and urges health authorities to take interim action and control measures against possible outbreaks of these two viruses. In addition, it reaffirms the importance of assertive communication between the veterinary and human health sectors in the context of "One Health" in a way that allows joint action to be taken.

Lista de cuadros

CUADRO 1: CASOS DE WNV POSITIVOS POR ELISA DE IGM EN EQUINOS DE COSTA RICA DESDE 2009 HASTA 2017	7
CUADRO 2: CEPAS VIRALES Y QUIMÉRICAS UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DE PLACAS (PRNT).....	18
CUADRO 3: TÍTULOS VIRALES DE CEPAS UTILIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS A LOS TIEMPOS DE LECTURA DETERMINADAS.	19
CUADRO 4: CEBADORES UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE FLAVIVIRUS EN MUESTRAS DE AVES Y MOSQUITOS. LA POSICIÓN EN EL GENOMA CORRESPONDE A LA SECUENCIA DEL VIRUS 17D YF	25
CUADRO 5: CEBADORES UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE WNV EN MUESTRAS DE AVES Y MOSQUITOS.	26
CUADRO 6: CEBADORES UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PREFERENCIAS DE ALIMENTACIÓN MEDIANTE UN FRAGMENTO DE COI	28
CUADRO 7: IDENTIFICACIÓN DE LAS UNIDADES HABITACIONALES PARA LOS MUESTREOS DE ÉPOCA SECA Y LLUVIOSA.	31
CUADRO 8: CANTIDAD Y TIPO DE MUESTRA OBTENIDA EN LA ZONA DE CUAJINIQUIL EN LOS DOS PERIODOS DE COLECTA.....	32
CUADRO 9: CANTIDAD Y TIPO DE MUESTRAS OBTENIDAS EN LA ZONA DE TALAMANCA EN LOS DOS PERIODOS DE COLECTA	33
CUADRO 10: CLASIFICACIÓN DE LAS AVES CAPTURADAS EN CUAJINIQUIL POR ORDEN, GÉNERO Y ESPECIE PARA CADA UNIDAD HABITACIONAL EN LAS DISTINTAS ÉPOCAS DE MUESTREO	35
CUADRO 11: CLASIFICACIÓN DE LAS AVES CAPTURAS EN TALAMANCA POR ORDEN, FAMILIA Y ESPECIE PARA CADA UNIDAD HABITACIONAL EN LAS DISTINTAS ÉPOCAS DE MUESTREO.....	36
CUADRO 12: NÚMERO TOTAL DE SUEROS EQUINOS ANALIZADOS POR ZONA Y ÉPOCA DE MUESTREO. ADEMÁS, SE MUESTRA EL NÚMERO DE ANIMALES POSITIVOS A LA CLASIFICACIÓN INICIAL Y EL NÚMERO DE POSITIVOS A LA POSTERIOR TITULACIÓN POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE PRNT $\geq 90\%$ CONTRA EL VIRUS DE SLEV Y WNV	46
CUADRO 13: NÚMERO TOTAL DE SUEROS DE SERES HUMANOS ANALIZADOS. ADEMÁS, SE MUESTRA EL TOTAL DE SUEROS CON NEUTRALIZACIÓN TOTAL EN LA CLASIFICACIÓN INICIAL Y EL NÚMERO DE SUEROS POSITIVOS A LA POSTERIOR TITULACIÓN POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE PRNT $\geq 90\%$ CONTRA LOS VIRUS DE WNV, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, ZIKV, YF Y SLEV	49
CUADRO 14: NÚMERO DE MUESTRAS ANALIZADAS Y RESULTADO DEL ENSAYO PRNT $\geq 90\%$ EN SUEROS DE AVES SILVESTRES POR ZONA Y ÉPOCA EN LAS DOS LOCALIDADES EVALUADAS.	50
CUADRO 15: NÚMERO DE MUESTRAS ANALIZADAS Y RESULTADOS DEL ENSAYO PRNT $\geq 90\%$ EN SUEROS DE GALLINAS DOMÉSTICAS POR ZONA Y ÉPOCA EN LAS DOS LOCALIDADES EVALUADAS.....	51

CUADRO 16: ESPECIES DE MOSQUITOS POSITIVAS A FLAVIVIRUS, LOCALIZACIÓN Y NÚMERO DE ACCESO DE LA SECUENCIA CON LA CUAL TIENEN UNA MAYOR IDENTIDAD	54
CUADRO 17: IDENTIFICACIÓN, ESPECIE Y DIVERSIDAD DE PATRONES DE ALIMENTACIÓN DE LAS HEMBRAS GRÁVIDAS COLECTADAS EN CUAJINIQUIL Y TALAMANCA.....	55

Lista de figuras

FIGURA 1: MAPA DE COSTA RICA CON LA DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS 16 UNIDADES HABITACIONALES MUESTREADAS EN LOS CANTONES DE TALAMANCA Y SANTA CRUZ.....	30
FIGURA 2: MAPA DEL CANTÓN DE SANTA CRUZ, GUANACASTE, CON LA DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS 8 UNIDADES HABITACIONALES EN LAS CUALES SE REALIZÓ EL MUESTREO EN LA ZONA DE CUAJINIQUIL	30
FIGURA 3: MAPA DEL CANTÓN DE TALAMANCA, LIMÓN, CON LA DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS 8 UNIDADES EN LA CUALES SE REALIZÓ EL MUESTREO.....	31
FIGURA 4: DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE MOSQUITOS EN LA ÉPOCA LLUVIOSA EN LA ZONA DE CUAJINIQUIL EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE JULIO – NOVIEMBRE, 2018.....	37
FIGURA 5: DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE MOSQUITOS EN LA ÉPOCA SECA EN LA ZONA DE CUAJINIQUIL EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE FEBRERO – ABRIL, 2018.	38
FIGURA 6: DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE MOSQUITOS EN LA ÉPOCA LLUVIOSA EN LA ZONA DE TALAMANCA EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE JULIO – AGOSTO 2018.....	39
FIGURA 7: DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE MOSQUITOS EN LA ÉPOCA SECA EN LA ZONA DE TALAMANCA EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE SETIEMBRE – NOVIEMBRE 2018.	40
FIGURA 8: COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE INDIVIDUOS CAPTURADOS EN LA ZONA DE CUAJINIQUIL EN LAS DOS ÉPOCAS DE MUESTREO BASADO EN LA LOCALIZACIÓN DE LAS TRAMPAS.....	41
FIGURA 9: COMPARACIÓN POR CANTIDAD DE INDIVIDUOS CAPTURADOS EN LA ZONA DE TALAMANCA EN LAS DOS ÉPOCAS DE MUESTREO BASADO EN LA LOCALIZACIÓN DE LAS TRAMPAS.....	41
FIGURA 10: PLACA DONDE SE MUESTRA LOS DIFERENTES TIPOS DE NEUTRALIZACION.	43
FIGURA 11: PLACA DONDE SE MUESTRAN LOS CONTROLES DE SUEROS Y LOS CONTROLES VIRALES.....	43
FIGURA 12: PLACA DONDE SE MUESTRA LA TITULACIÓN DEL SUERO ESCL15.	44
FIGURA 13: CORRELACIÓN ENTRE LA EDAD Y LA SEROPOSITIVIDAD A WNV EN EQUINOS DE LA ZONA DE CUAJINIQUIL.	57
FIGURA 14: CORRELACIÓN ENTRE LA EDAD Y LOS EQUINOS CLASIFICADOS COMO FLAVIVIRUS POSITIVOS EN LA ZONA DE CUAJINIQUIL..	58

Lista de abreviaturas

CHIKV: Virus de Chikungunya
CDC: Center of Disease Control and Prevention
CO₂: Dióxido de Carbono
DEPC: Dietil pirocarbonato
DENV: Virus del Dengue
MEM: Medio esencial mínimo
PBS: Phosphate-buffered saline/Salina fosfato bufferada
PRNT: Ensayo de neutralización mediante reducción de placas
RT-PCR: Retro-transcripción y posterior reacción en la cadena de la polimerasa
SLEV: Saint Louis encephalitis virus, Virus de la encefalitis de San Luis
SFB: Suero fetal bovino
UCR: Universidad de Costa Rica
UFP: Unidad formadora de placa
UNA: Universidad Nacional
VERO: "*Verda reno*" línea celular de riñón de mono verde africano
ZIKV: Virus del Zika
WNV: West Nile Virus, Virus del Oeste del Nilo

1. Antecedentes

1.1. Generalidades del virus del Oeste del Nilo

El virus del Oeste del Nilo (WNV) pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. Dentro de este género está clasificado en el serogrupo de la encefalitis Japonesa al cual también pertenecen los virus: Valle de Murray (MVEV), Dengue (DENV), Fiebre Amarilla (YFV), Encefalitis Japonesa (JEV), Koutango (KOU), Cacipacore (CPC), Kunjin (KUN), Usutu (USU), Alffuy (ALF), Yaounde (YAO) y el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV) (1). Además de esta clasificación, ecológicamente pertenece a un gran grupo de agentes que son transmitidos por artrópodos los cuales se denominan arbovirus (1).

El virus de WNV es envuelto y presenta una arquitectura icosaédrica compuesta por múltiples copias de una cápside proteica. Posee un genoma de una sola hebra ARN polaridad positiva, el cual presenta un solo marco de lectura abierto de 10 302 nucleótidos que codifican para una poliproteína, la cual es procesada por proteasas virales y celulares en tres proteínas estructurales: la cápside (C), envoltura (E) y la premembrana (prM) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (1, 2). La porción terminal del genoma presenta estructuras terciarias que juegan un papel importante en funciones regulatorias de replicación y ensamblaje (2). En cuanto a las proteínas no estructurales, éstas están involucradas en la replicación y en el ensamblaje viral: NS1 y NS4A participan en la replicación viral, NS2A en el ensamblaje y la liberación del virión, NS3 y NS2B tienen actividad proteolítica y NS5 actúa como una polimerasa (2).

La proteína E cumple múltiples funciones como son el tropismo y la unión al receptor celular, se asocia con la virulencia, media la hemaglutinación y es la proteína más importante para la antigenicidad (3). Contiene tres dominios antigénicos (I, II, III), de los cuales el dominio III es el que posee los epítomos que median la neutralización del virus (2). Además, juega un importante papel en la unión a la membrana celular, lo que permite la endocitosis del virus y posterior acidificación. Esto provoca un cambio conformacional que permite la unión entre las membranas, por lo que esta proteína es crucial para el inicio de la infección y tiene potencial para ser blanco del desarrollo de estrategias antivirales (4, 5).

La antigenicidad es además la base de la clasificación WNV en dos linajes: 1 y 2 (2). El linaje 1 tiene distribución a nivel mundial y ha sido asociado con casos más severos de la

enfermedad, mientras que el linaje 2 solo se ha encontrado en el continente africano y es asociado a casos más leves (6, 7).

1.2. Origen de la enfermedad e introducción a América

El primer reporte de la enfermedad se presentó en el distrito de West Nile, Uganda en el año 1937. El hallazgo se da luego de una investigación que se centró en identificar la causa de un brote de enfermedad febril en personas. En una de las pacientes, la cual presentó una fiebre moderada sin diagnóstico clínico, se logró identificar un agente viral no reportado anteriormente al cual se le llamó WNV (8). Luego de este primer incidente se presentaron brotes especialmente en Israel en los años 1951-1953, 1957, 1980, 1990 (9, 10). Durante estos brotes las personas cursaron con fiebre que generalmente era auto limitada y no presentaron mayor complicación clínica. Sin embargo, en el 2000 se observó un cambio en la epidemiología cuando se presentaron nuevos brotes en el Este de Europa asociados con enfermedad neurológica, provocando 400 casos clínicos y 40 muertes (9).

El primer reporte de WNV en el continente americano se dio en la ciudad de Nueva York, Estados Unidos en agosto de 1999, cuando se presentó un aumento inusual de casos de encefalitis en seres humanos y equinos (11). Estos casos inicialmente se asociaron con el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV) (12). Concomitantemente se presentó una muerte masiva de cuervos y aves de diferentes especies en los zoológicos de la ciudad. Posteriormente, mediante el aislamiento y secuenciación del virus proveniente de una muestra de tejido cerebral de un ser humano, se logró reconocer el agente causal de las encefalitis, el cual se identificó como WNV linaje 1 (11, 13). Además, se confirmó que las muertes masivas de aves y las encefalitis en equinos fueron por esta misma causa (12, 14). Los análisis filogenéticos realizados a las muestras relacionaron la cepa que circuló durante este brote, con una cepa de ganso aislada en Israel en 1998, con la cual comparte un 99,8% de identidad (15).

Entre los años 2001 y 2004, mediante análisis serológicos se encontró evidencia de la propagación del virus hacia otros estados dentro de los Estados Unidos, así como a Canadá, México, Jamaica, Belice, Guatemala, El Salvador, Cuba, Bahamas y Colombia (16, 17). En Jamaica, en el año 2001, se reportaron 17 aves residentes (*Turdus aurantius*, *Myiopagis cotta*, *Coereba flaveola*, *Tiaris bicolor*) seropositivas de 348 analizadas (4.9%) (18). En mayo del 2003, en México, se reportó el primer aislamiento del virus en un *Corvus*

corax (19). Posteriormente, Argentina reportó transmisión del virus en equinos en el año 2006 (20).

En los países latinoamericanos no se han presentado muertes masivas de aves, sin embargo, se ha encontrado evidencia serológica de circulación del virus en animales silvestres y domésticos (aves, perezosos, equinos, cocodrilos) (16, 20, 21). Actualmente, en Estados Unidos el virus se adaptó a las condiciones ambientales y vectoriales con nuevos reportes cada año por lo que se considera endémico (22).

Varios estudios han evidenciado la presencia del virus en la región utilizando diferentes metodologías de laboratorio. Uno de ellos fue desarrollado en Guatemala y se identificó a un *Quiscalus mexicanus* y un *Turdus grayi* como potenciales reservorios del virus (23). Ambas especies se encuentran ampliamente distribuidas en nuestro país (24). En el caso de los mosquitos las especies que se identificaron como vectores de la enfermedad fueron *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. mollis* y *Cx. inflicus*. Otro estudio realizado en la Península de Yucatán, México en los años 2003-2004, determinó la seroprevalencia en diferentes especies animales (25). En ese estudio se analizaron 144 sueros equinos, 415 vertebrados pertenecientes al zoológico de Mérida (257 aves, 52 mamíferos y 106 reptiles), así como 7 cocodrilos de ciudad del Carmen. Se determinó que 90 equinos (62%) fueron positivos por ELISA, de los cuales 75 (52%) fueron confirmados por medio del ensayo de neutralización por reducción de placas (PRNT), así como 7 aves, un jaguar, un coyote y seis cocodrilos (25). En Yucatán se llevó a cabo otro estudio el cual se enfocó en determinar la prevalencia de WNV en aves residentes de la región por medio de RT-PCR. Se analizaron 104 aves de las cuales 11 especies diferentes de tres órdenes resultaron positivas (27% Paseriformes, 33% Piciformes y 6% Columbiformes) (26). Las especies positivas fueron: tortolita (*Columbina talpacoti*), guacharaca norteña (*Ortalis vetula*), búho americano (*Bubo virginianus*), zopilote negro (*Coragyps atratus*). Todas estas aves se encuentran presentes en Costa Rica (24).

1.3. Ciclos enzoóticos y epizoóticos

WNV presenta un ciclo enzoótico, el cual se mantiene y se amplifica en la naturaleza. El ciclo lo componen mosquitos ornitofílicos (mosquitos que mayormente se alimentan de aves) como vectores y las aves, las cuales funcionan como amplificadores y reservorios (27).

A pesar de que se han identificado alrededor de 60 especies de mosquitos infectados con WNV en Estados Unidos, la capacidad vectorial se ha asociado a diferentes especies del género *Culex*. El término capacidad vectorial se define como: una especie capaz de mantener la transmisión del virus, para lo cual debe de ser susceptible a la infección, poseer preferencia por el hospedero (especialmente las hembras adultas), así como, poseer concomitancia en el tiempo y el espacio con el hospedero (28).

Entre las especies asociadas como vectores competentes se encuentran: *Culex tarsalis*, el cual es el principal vector en el Oeste de los Estados Unidos y *Cx. pipiens*, *Cx. restuans* y *Cx. salinarius* en el noreste. Otras especies de *Culex* (*Cx. quinquefasciatus*, *Cx. stigmatosoma*, *Cx. thriambus*, *Cx. nigripalpus*) poseen capacidad vectorial tanto para la transmisión como para desarrollar la infección (27, 29). De estas especies, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. thriambus*, *Cx. nigripalpus* han sido reportadas presentes en Costa Rica (30).

En el caso de las aves, ciertas especies han sido descritas como hospederos competentes. Este término define al hospedero que desarrolla una viremia, la cual posee el título y la duración suficiente para infectar vectores por medio de alimentación sanguínea en un hábitat natural (31). Ciertas especies de aves sufren algún tipo de enfermedad clínica (letargia, plumas erizadas, postura inusual, inhabilidad para sostener la cabeza, ataxia), en casos más severos de la enfermedad las puede llevar a la muerte, otras especies no manifiestan ningún tipo de sintomatología (32).

En los Estados Unidos se ha determinado que las especies más susceptibles a la enfermedad son el *Passer domesticus* y el *Corvus corax*, pero los mosquitos solo se alimentan ocasionalmente de estas especies (33). El *Passer domesticus* está presente en todos los tipos de hábitat en Costa Rica, por el contrario la distribución de *Corvus corax* se extiende hasta el Norte de México (24).

La especie a la cual se le ha asociado como la responsable de mantener y amplificar el virus es el *Turdus migratorius* debido a una combinación entre las preferencias de alimentación de los mosquitos y la capacidad del hospedero para amplificar el virus. El rango de hábitat para esta especie va desde el Norte de Canadá hasta el Norte de Guatemala, por lo que no se encuentra en Costa Rica (24). Ciertas especies de aves como

las gallinas domésticas no presentan signos de enfermedad, sin embargo, sí ocurre la seroconversión, por lo que pueden ser utilizadas como centinelas (14, 32, 34).

Los mosquitos, luego de alimentarse de un ave infectada, presentan replicación inicial del virus en las células del intestino medio. Luego de esta primera replicación, el virus viaja a través de la hemolinfa a las glándulas salivales. La replicación del virus en las glándulas salivales conlleva a que este pueda ser transmitido a otras aves o a mamíferos durante la siguiente alimentación (35). Además, se ha descrito en *Cx. pipiens* dos maneras en las cuales el virus se mantiene durante los meses de invierno: la primera es la capacidad de entrar en un periodo de diapausa y mantener el virus hasta la primavera siguiente, la segunda es la transmisión vertical a la prole (36).

El virus es transmitido a las aves por un mosquito infectado durante la alimentación. Luego de la inoculación se da una replicación inicial, la cual dura entre 1-3 días. La infección puede persistir en la piel hasta 14 días post infección (27). Komar *et al.*, 2003, determinó otras posibles rutas de infección en las aves (32). Una de las probables rutas se da mediante el consumo de las carcasas de otras aves o ratones infectadas, así como, mediante el consumo de mosquitos infectados. En ese estudio, algunas especies de aves adquirieron el virus mediante el consumo de agua contaminada o por contacto directo con otra ave infectada. Al mismo tiempo se logró documentar que las aves excretan el virus por la cavidad oral y la cloaca (32).

La probabilidad de infección, diseminación y transmisión depende de la carga viral, la cual está directamente relacionada con la magnitud y duración de la viremia que van a tener las aves que funjan como amplificadoras. Las altas temperaturas, están asociadas a mayores tasas de replicación viral en mosquitos lo que acelera la diseminación y disminuye los periodos de incubación (37). En el caso de *Cx. pipiens* y *Cx. tarsalis* se ha demostrado que, en el oeste de los Estados Unidos, estos mosquitos se alimentan de mamíferos y humanos en lugar de aves durante el fin del verano y el inicio del otoño, debido a la escasez de estas por el inicio de la migración hacia el Sur del continente. Este cambio de hábito de alimentación concuerda con un aumento de la población de mosquitos, lo cual, sumado a una mayor cantidad de personas al aire libre, da como resultado que *Cx. pipiens* y *Cx. tarsalis* sean considerados los principales vectores involucrados en facilitar la transmisión entre las aves y los humanos (37).

Cuando los mosquitos se alimentan de seres humanos y otros mamíferos funcionan como hospederos accidentales los cuales se caracterizan por ser incapaces de transmitir el virus, pero con posibilidad de presentar enfermedad clínica o neurológica (12). La mayoría de las personas son asintomáticas (80%) o presentan una fiebre leve (20%), de los cuales solo el 1% desarrolla la presentación clínica en sistema nervioso central (SNC) (38).

Entre las complicaciones que se pueden desarrollar se encuentra: meningitis, encefalitis, parálisis flácida, desorientación y muerte (7). La gravedad de los síntomas aumenta con la edad, siendo los adultos mayores los más afectados (39). Las personas que desarrollan síntomas presentan un cuadro clínico caracterizado por una fiebre aguda, dolor de cabeza, fatiga, dolor muscular, malestar y debilidad. Además, se han reportado síntomas gastrointestinales y máculas hemorrágicas en el tronco y las extremidades. Generalmente, los síntomas duran entre 3 a 6 días. Los pacientes luego de la recuperación manifiestan secuelas como dificultad para concentrarse, dolor en el cuello, fatiga y dolor muscular (7, 40). En un estudio realizado en Houston, Estados Unidos, el 40% de las personas continuaban experimentando síntomas 8 años después de haber presentado la enfermedad (fatiga, debilidad, dolor en el área del cuello, pérdida de memoria, confusión entre otras), estas secuelas se presentaron especialmente en las personas que sufrieron encefalitis (41).

En el año 2018 en Estados Unidos, se presentaron 1658 casos de enfermedad neuroinvasiva en seres humanos, 989 de enfermedad no neuroinvasiva y 167 muertes asociadas a WNV. Desde su introducción se han presentado alrededor de 50 830 casos de enfermedad clínica y 2330 muertes (CDC, <https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/cumMapsData.html>. revisado 29 de julio de 2019). En el caso de los equinos para el año 2018, en Estados Unidos se reportaron 493 casos en 42 estados, para un total desde el año 2005 de 5859 casos confirmados. Este reporte no especifica cuántos animales fallecieron a causa del virus. (CDC, https://www.aphis.usda.gov/animal_health/downloads/animal_diseases/2018-wnv-report.pdf. revisado 29 de julio de 2019)

La presentación clínica en los equinos es similar a los seres humanos. Los caballos que manifiestan enfermedad de SNC pueden tener enfermedad nerviosa aguda, ataxia, debilidad, incoordinación, temores musculares, entre otros (14). La resolución de los síntomas puede llevar de 2 a 7 días y generalmente se logran recuperar totalmente, un

porcentaje de los animales muere (20 - 30%) a causa de complicaciones propias de la enfermedad o es sometido a eutanasia (14).

1.4. Situación del WNV en Costa Rica

En Costa Rica, desde el año 2004 se encontró evidencia serológica de contacto con el virus en equinos asintomáticos de la zona de Liberia, Filadelfia y Bolsón en la provincia de Guanacaste (42). En el año 2009 se presentaron los primeros casos de enfermedad clínica en equinos asociados a WNV. Los animales presentaban ataxia, incoordinación, euforia, ceguera y fiebre (Unidad de Epidemiología, SENASA, <https://www.senasa.go.cr/informacion/centro-de-informacion/informacion/estado-sanitario/boletines-epidemiologicos>, semana epidemiológica 47 y 49, revisado el 29 de julio de 2019). El diagnóstico se realizó en el Laboratorio de Virología de la Universidad Nacional, mediante un ELISA de captura de IgM (43, 44). Posterior a este primer reporte, anualmente se continúan presentando animales positivos. Entre el año 2009-2017 se presentaron 32 casos de equinos sintomáticos positivos a WNV por la técnica de ELISA (cuadro 1) (45).

Cuadro 1: Casos de WNV positivos por ELISA de IgM en equinos de Costa Rica desde 2009 hasta 2017, Laboratorio de Virología, Universidad Nacional (46)

Año	Número de Casos positivos por ELISA de IgM	Cantones
2009	5	Abangares, Cañas, Liberia.
2012	2	Nicoya
2013	2	Santa Cruz, Abangares, Orotina
2014	2	Santa Cruz, Nicoya, Talamanca
2015	3	Atenas
2016	17	Santa Cruz, Tilarán
2017	1	Santa Cruz
Total	32	

Además, en el año 2013 se reportó un caso positivo por RT-PCR en una granja avícola de emús (*Dromaius novaehollandiae*) en la zona de San Mateo, Alajuela. En esta granja, 2 animales murieron y 4 presentaron sintomatología nerviosa: ataxia, incoordinación, tambaleo, debilidad de extremidades, paresia, convulsiones y depresión (Unidad de

Epidemiología, SENASA, <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/111113010430.pdf>, revisado 23 de junio de 2017). En el mismo año, se realizó un estudio de seroprevalencia a nivel nacional por parte del Laboratorio de Virología de la Universidad Nacional en conjunto con el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA). Para este estudio se recolectaron 241 sueros de equinos de todo el país (3 equinos por cantón, a excepción de Tibás). Por medio de un ELISA IgG de captura utilizando una proteína recombinante para WNV, se determinó que el 59% de los animales fueron positivos (47). A pesar de la sensibilidad que presenta el ELISA de IgG, la reacción cruzada entre los Flavivirus está ampliamente descrita y estos resultados se consideran presuntivos (48–52). Por lo tanto, la manera ideal de corroborar estos resultados serológicos es mediante los ensayos de reducción de placas virales (PRNT por sus siglas en inglés), de manera que se pueda comprobar que son anticuerpos específicos contra WNV (49, 53).

Otros estudios en vida silvestre a nivel nacional se han llevado a cabo en diferentes especies. Entre el año 2005 y el 2007 se realizó un muestreo de 109 perezosos de dos dedos (*Choloepus hoffmanni*) y de tres dedos (*Bradypus variegatus*). De estos animales, un 15% presentaba anticuerpos para WNV confirmados por medio de PRNT (54). En el año 2015, Romero-Vega reportó un caso positivo por RT-PCR en un *Chlorophanes spiza* (55). Mediante secuenciación tipo Sanger, la cepa fue caracterizada como similar a una obtenida en de un ave en Iowa 2003 y perteneciente al linaje 1a (55). Más recientemente en un estudio retrospectivo en monos de vida libre se determinó que tres monos aulladores (*Alouatta palliata*) fueron positivos a WNV mediante RT-PCR (56). Sin embargo, los productos obtenidos no fueron analizados genéticamente (secuenciación) para determinar el linaje. En este mismo estudio se realizó un ELISA comercial para la detección de anticuerpos contra la proteína de E de WNV. El 25.4% de los monos fueron positivos por esta metodología, no obstante las muestras no fueron corroboradas por medio de PRNT y no se puede descartar eventos de serocruzamiento con otros Flavivirus (56).

En el caso de los seres humanos, no hay información disponible por parte de Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) de casos positivos a WNV. Sin embargo, el Laboratorio de Virología de la UNA, por referencia del Hospital México y el Hospital Nacional de Niños, han diagnosticado algunos casos presuntivos por ELISA de IgM. Sin embargo, no se les realizó ensayos de PRNT por lo cual

no se puede descartar reacciones cruzadas con otros Flavivirus (Jiménez-Sánchez, comunicación personal).



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, María Marta Piche Ovaris, con cédula de identidad 401970905, en mi condición de autor del TFG titulado Detección del virus del Oeste del Nilo en dos localidades con antecedentes de enfermedad neurológica en equinos: determinación molecular en aves y mosquitos y serología en humanos: aves y equinos.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: 1 año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: María Marta Piche Ovaris

Número de Carné: AG438-1 Número de cédula: 4-0197-0905

Correo Electrónico: mmpo88@gmail.com

Fecha: 6 de noviembre de 2019 Número de teléfono: 88604307

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Eugenia Corrales Aguilar


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

2. Justificación

En Costa Rica el reporte de casos clínicos de WNV, la seroprevalencia establecida por el SENASA en el 2013, el estudio realizado por Medlin *et al* 2016 en perezosos, junto con el estudio serológico realizado por Hobson-Peters en el año 2004 evidencian la circulación activa del virus en equinos y perezosos (42, 47, 54). La presencia de este virus podría representar un importante problema de salud pública debido a que la presentación clínica en humanos es similar a DENV-1, DENV-2 y DENV-3 (que son endémicos en Costa Rica) así como a ZIKV del cual hay reportes desde el año 2016 (57). Por lo tanto, los casos clínicos podrían estar subdiagnosticados con la consecuencia de no estar tomando las decisiones correctas para su manejo clínico o su control epidemiológico.

Costa Rica tiene una de las avifaunas más diversas de América Latina con 902 especies de aves de las 9000 que son conocidas a nivel mundial (24). Esta diversidad de aves representa un gran número de reservorios potenciales para este agente viral. Actualmente se desconoce cuál o cuáles son las aves que podrían funcionar como reservorio(s) del virus en el país. Además, Costa Rica representa un importante paso de aves migratorias, de las cuales unas permanecen en el país y otras continúan su migración hacia el Sur. En el caso de los mosquitos, en el país existen 10 subgéneros y 62 especies de *Culex* reportadas (58). Algunos de las especies se han señalado en otros estudios como posibles vectores (23, 29).

Debido a lo anterior, el identificar cuáles aves y mosquitos son positivos a WNV por medio de técnicas moleculares proporcionaría información epidemiológica básica para determinar los linajes que circulan en el país. Además, es fundamental implementar la técnica de PRNT para poder determinar si los anticuerpos encontrados van dirigidos a WNV y no son producto de reacciones cruzadas con otros Flavivirus endémicos o no en el país. Este es el primer estudio en Costa Rica que contempla el análisis serológico de las aves, seres humanos y equinos mediante esta técnica. De esta manera se podrá evidenciar de manera inequívoca la circulación activa del virus en Costa Rica, aportando así información que podrá ser utilizada para futuras investigaciones, así como por el Ministerio de Salud y el Servicio Nacional de Salud Animal para instaurar medidas preventivas en el país.

3. Hipótesis

En las dos localidades geográficas en Costa Rica (Cuajiniquil y Talamanca) a evaluar existe evidencia tanto serológica como molecular de la presencia del Virus del Oeste del Nilo en aves, mosquitos, humanos y equinos.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Identificar aves y mosquitos positivos al virus del Oeste del Nilo y evaluar en humanos, equinos y aves la presencia de anticuerpos contra WNV con el fin de determinar si hay evidencia de la exposición previa al virus, en dos localidades con enfermedad neurológica en equinos asociada con el virus.

4.2. Objetivos Específicos

- 4.2.1.** Determinar cuáles especies de aves (reservorios) son positivas al WNV con el fin de evidenciar la presencia del virus en las dos localidades.
- 4.2.2.** Determinar cuáles especies de mosquitos (posibles transmisores) son positivas a WNV, así como sus preferencias de alimentación, con el fin de evidenciar la presencia del virus en las dos localidades.
- 4.2.3.** Determinar la presencia de anticuerpos contra WNV en humanos (hospederos accidentales), equinos (hospederos accidentales) y aves (reservorios) en las dos localidades con el fin de evidenciar la exposición previa al virus.

5. Materiales y métodos

5.1. Sitios de muestreo

El estudio se desarrolló en dos localidades con antecedentes de enfermedad neurológica en equinos asociada a WNV (45). En cada sitio se utilizó un muestreo de “bola de nieve” en el cual se eligieron 8 unidades habitacionales por sitio. Cada una debía cumplir con los requisitos de inclusión: poseer al menos un equino que no estuviera vacunado contra WNV, además de un parche boscoso cerca de la estructura que funciona como casa o unidad habitacional, así como, que las personas estuvieran anuentes a participar en el estudio después de firmar el consentimiento informado y llenar una encuesta. El muestreo se llevó a cabo en dos épocas: lluviosa (más de 250 mm de lluvia/mes) y seca (menos de 100 mm de lluvia/mes), para un total de dos muestreos por unidad habitacional.

El primer sitio fue la zona de Cuajiniquil, distrito 6 del cantón de Santa Cruz (10°15'06 N, 85° 41'07 O), Guanacaste, región Pacífico Norte. Esta localidad se escogió debido a su endemicidad para arbovirus ya que en años anteriores el Ministerio de Salud reportó casos de DENV (611 casos en el año 2016) (Ministerio de Salud, Situación del Dengue 2016, <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud / analisis-de-situacion-de-salud/2860-dengue-2016-1/file> revisado 01 de octubre de 2017). Además, se han presentado casos de equinos positivos a WNV por ELISA de IgM así como, evidencia serológica en estudios previos (42, 45, 47).

De acuerdo con el Instituto Meteorológico Nacional (IMN), el Pacífico Norte es una de las zonas más secas del país. Cuajiniquil pertenece a la Unidad Peninsular la cual presenta una altura media de 300 msnm. El período seco abarca los meses de diciembre a marzo en los cuales solo precipita un 4% del total de lluvias anuales. El primer período lluvioso se presenta entre mayo y agosto cuando precipita un 50% del total anual. Entre julio y agosto se presenta una disminución en la precipitación la cual nuevamente se ve incrementada en setiembre y se extiende hasta noviembre. La precipitación anual es cercana a los 1900 mm. La temperatura máxima durante el día ronda los 33°C y durante la noche 22°C. La zona presenta una deforestación importante especialmente porque las tierras se han dedicado a la cría de ganado de engorde (Instituto Meteorológico Nacional, Clima en Costa Rica: Pacífico Norte, <https://www.imn.ac.cr/clima-en-costa-rica>, revisado el 26 de octubre de

2018). En esta región los muestreos se llevaron a cabo entre agosto-noviembre 2017 (época lluviosa) y febrero-abril 2018 (época seca).

La segunda zona de estudio fue Talamanca (9°37'14.99"N, 82 50'39.98"O), cantón 4 de la provincia de Limón, región Caribe Sur. Esta zona se escogió debido a que en el año 2014 se diagnosticó un caso positivo a WNV en un equino (45). Además, ha presentado abundantes casos anuales de DENV y de ZIKV (INCIENSA, Informes epidemiológicos año 2016, 2017 y 2018 https://www.inciensa.sa.cr/actualidad/Informes%20de%20vigilancia.aspx#HERMES_TABS_1_3, Ministerio de Salud, <https://www.ministerio.desalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/analisis-de-situacion-de-salud>, revisadas 29 de julio de 2019). Conjuntamente, entre junio 2017 – julio 2018 se analizaron 43 sueros de personas sintomáticas (fiebre, dolor de cabeza, malestar generalizado entre otros) de la zona de Hone Creek, en el marco de un proyecto de acción social del Laboratorio de Virología Médica de la Facultad de Microbiología, UCR. El 58% (n=25) de las muestras analizadas resultaron negativas a DENV, ZIKV y CHIKV (Registro del Laboratorio de Virología Médica, UCR). Debido a lo anterior otros agentes arbovirales con sintomatología similar deben ser considerados.

El Caribe Sur comprende desde la ciudad de Turrialba, parte de la Cordillera de Talamanca, el Valle de la Estrella y termina en Sixaola hacia la costa. La precipitación oscila entre 3000 y 2500 mm. En esta región se presentan dos periodos lluviosos interrumpidos por mínimos relativos. El primer periodo de baja de lluvias se presenta entre setiembre y octubre. A partir de noviembre se inicia un periodo más lluvioso que finaliza en febrero. En este periodo precipita el 40% del total anual de lluvias. Entre febrero y marzo se presenta el segundo mínimo relativo. Un nuevo periodo lluvioso se inicia en abril y finaliza en agosto-setiembre. Los habitantes de la zona se dedican mayoritariamente a la producción agrícola de banano (Instituto Meteorológico Nacional, Clima en Costa Rica, Caribe Sur, <https://www.imn.ac.cr/clima-en-costa-rica>, revisado el 26 de octubre de 2018) En la zona se realizó un muestreo en época lluviosa (julio-agosto 2018) y en período de mínimas precipitaciones (esta época para efectos del trabajo se le denominará época seca) (setiembre-noviembre 2018).

5.2. Captura y clasificación de aves y mosquitos

Para la captura de aves se utilizaron redes de niebla de poliéster de 32 mm (Avinet). Las redes tienen capacidad de captura desde passeriformes pequeños hasta pájaros de tamaño medio (Avinet, <https://www.avinet.com/es/node/127>, revisado el 01 de julio, 2019). En cada sitio se colocaron 2 redes. La red denominada “bosque” se colocó entre parches boscosos y zonas abiertas, así como en bosques de galería lo cual aumentó el éxito de la captura debido a que las aves lo utilizan como zona de paso. La red denominada “peridomiliar” se colocó entre 3 a 5 metros de la unidad habitacional. El objetivo de la colocación de trampas es dos sitios fue aumentar la diversidad de especies capturadas. Las redes se abrieron alrededor de las 15:00 horas y se cerraron cerca de las 18:00 horas, las mismas se revisaron cada 20 minutos para verificar si algún espécimen había sido capturado. En caso de lluvia intensa las redes se cerraron hasta el cese de la lluvia para evitar mortalidades (59). Las aves capturadas fueron introducidas en bolsas de material algodónoso para su transporte al laboratorio de campo.

Los mosquitos fueron atrapados mediante trampas de luz tipo CDC con CO₂. En total cuatro trampas fueron colocadas (intradomiliar, peridomiliar, establo y bosque) durante 12-14 horas (durante la noche) y se retiraron a la mañana siguiente. La trampa intradomiliar se colocó dentro de la unidad habitacional en un lugar que fuera frecuentado por las personas de la casa. La trampa peridomiliar se colocó en la parte externa de la casa. La trampa establo se colocó en el recinto que funcionaba para tal fin, si la finca no contaba con un establo se colocó cerca del sitio que se utiliza para el descanso de los animales. La trampa bosque se colocó en el parche boscoso cercano a la casa. El objetivo de colocar trampas en diferentes sitios fue aumentar la diversidad de especies capturadas (zoofílicas, antropofílicas, endofílicas, y exofílicas).

Posteriormente, los mosquitos fueron agrupados por trampa y transportados al laboratorio donde fueron clasificados a nivel de especie de acuerdo con las claves de Darsie, 1993 y Vargas 1998, por expertos en el Laboratorio de Investigación en Vectores, UCR (58, 60). Luego de la clasificación, los mosquitos de cada trampa fueron agrupados en pools de acuerdo con la especie. Cada pool contenía un máximo de 20 individuos. En el caso que se identificaran hembras grávidas, estas se clasificaron según la especie y fueron analizadas individualmente para determinar sus preferencias de alimentación.

Para las capturas de aves y mosquitos se contaron con los permisos del CICUA (CICUA-042-17), la Comisión de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica (VI-2994-2017), Sistema Nacional de Áreas de Conservación, área de conservación Tempisque, Programa de Investigación y Monitoreo Ecológico (Oficio-ACT-PIM-070-17) y el Área de Conservación La Amistad-Caribe (M-PC-SINAC-PNI-ACLAC-047-2018) (Ver anexos).

5.3. Toma de muestras para los diferentes análisis

Las primeras 5 aves atrapadas fueron identificadas utilizando las claves taxonómicas establecidas por la guía de aves de Costa Rica (24). Seguidamente, se realizó la eutanasia con una sobredosis de xilacina y ketamina siguiendo los protocolos establecidos por la Asociación Americana de Médicos Veterinarios y con el permiso del CICUA institucional (CICUA-042-17) (61). La muestra de sangre completa se tomó por punción intracardiaca posterior al proceso de eutanasia (la cantidad de sangre colectada dependió del tamaño del ave capturada). A las aves domésticas (gallinas) se les tomó una muestra de sangre de la vena alar o metatarsal. Posteriormente, las muestras de sangre se separaron del suero mediante centrifugación (5 minutos, 4000 rpm), Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su arribo al laboratorio, luego fueron almacenadas a -70 °C.

Seguidamente, se realizó la necropsia correspondiente y se tomaron muestras individuales de diferentes órganos (corazón, pulmón, hígado, bazo, intestino, riñón, cerebro, tracto reproductor, ojo, rodilla, proventrículo), adicionalmente se realizó un pool de órganos. Las muestras fueron almacenadas en viales de 1,5 ml con ARN later® (Ambion, AM7021) a -70 °C hasta su procesamiento (32).

En el caso de los equinos, se les tomó una muestra de sangre completa mediante venipunción de la vena yugular (aproximadamente 9 ml); además, se tomaron datos como: anamnesis, edad, estatus vacunal, (si el dueño reportaba vacunación para WNV el animal quedaba excluido del estudio) y movilizaciones recientes. La información se encuentra almacenada en archivos del Laboratorio de Virología Médica, UCR. Posteriormente, se separó el suero mediante centrifugación (5 minutos, 4000 rpm), Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su arribo al laboratorio, luego fueron almacenadas a -70 °C. Solo se utilizaron animales mayores a 6 meses de edad para evitar cualquier tipo de interferencia con anticuerpos maternos (62).

En el caso de las personas, se les tomó una muestra de sangre por venipunción y se les realizó una encuesta para conocer su anamnesis. Solo se tomaron muestras de las personas que firmaron previamente el consentimiento informado aprobado por el CEC (acuerdo VI-4050-2017) de la UCR. Posteriormente, se separó el suero mediante centrifugación (5 minutos, 4000 rpm), las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su arribo al laboratorio, luego fueron almacenadas a -70 °C

5.4. Líneas celulares y cepas virales utilizadas en los ensayos serológicos de PRNT

Los ensayos serológicos de PRNT se llevaron a cabo en células VERO (ATCC® CCL-81™), las cuales se crecieron en MEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina y se mantuvieron a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂. Esta línea celular también se utilizó para propagar las semillas virales, titulación del virus y realizar los ensayos de neutralización (descrito más adelante, 5.4.1, 5.5).

Las células se crecieron en botellas de cultivo celular (Greiner Bio-One, 658170), una vez que alcanzaron su confluencia del 100% se tripsinizaron (Sigma-Aldrich, T4799) y sembraron de acuerdo con el área de cada una de las placas (Greiner Bio-One, 662160, 677180, 655160) que se utilizaron. De esta manera, se sembró para placa de 24 hoyos, 200 000 células por hoyo, para placa de 48 hoyos, 100 000 células por hoyo y para placa 96 hoyos, 25 000 células por hoyo.

5.4.1. Propagación de las diferentes semillas virales para los ensayos de neutralización

Para los ensayos de PRNT se utilizaron cepas virales de virus de referencia, así como virus quiméricos donados por el CDC. En el caso de las cepas quiméricas utilizadas en este estudio, estos virus poseen los genes de cápside y las siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) de la cepa vacunal de Fiebre Amarilla 17D y los genes que codifican para las proteínas estructurales de la envoltura y la premembrana de cada uno de los virus específicos SLEV, WNV, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4

(cuadro 2). Las quimeras fueron utilizadas debido a estos virus representan un mínimo riesgo biológico y se pueden manipular en laboratorios de bio-contención 2.

Cuadro 2: Cepas virales y quiméricas utilizadas en los ensayos de neutralización por reducción de placas (PRNT). Las cepas quiméricas se encuentran identificadas con *.

Virus	Virus quimérico/Cepa viral
SLEV*	YFV 17D/SLEV CorAn 9124
WNV*	YFV 17D/WNV Flamingo 383-99
DENV-1*	YFV 17D/DENV-1 PUO 359
DENV-2*	YFV 17D/DENV-2 218
DENV-3*	YFV 17D/DENV-3 PaH881/88
DENV-4*	YFV 17D/DENV-4 1228
ZIKV	ATCC VR-748
YFV	YFV 17D

Cada uno de los virus fue inoculado con una multiplicidad de infección (MOI por sus siglas en inglés) de 0.1 basado en el título que indicaba el inserto del CDC, en células VERO con un 90% de confluencia. A cada una de las cepas se les realizó un segundo pasaje. Cuando se observó efecto citopático en el segundo pasaje se congeló el sobrenadante de las botellas en alícuotas de 500 µl con 20% de SFB a -70 °C hasta su posterior uso. Los virus de WNV, DENV-2 y SLEV se congelaron a los 4 días, DENV-3 y DENV-4 a los 6 días y DENV-3 a los 8 días.

5.4.2. Titulación de los virus

La titulación viral se llevó a cabo en placas de 24, 48 y 96 hoyos dependiendo del tamaño de placa que se iba a utilizar en los ensayos posteriores. A cada hoyo se le sembró la cantidad de células según el área y se crecieron en MEM suplementado con un 10% SFB, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina y se mantuvieron a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂. Cuando la placa se encontraba confluyente se realizaron diluciones seriadas de la semilla viral en base 2 hasta la dilución -5 en un volumen final de 200 µl para las placas de 24 hoyos, 100 µl para las placas de 48 hoyos y 50 µl para las placas de 96 hoyos respectivamente. Las placas se incubaron 1 hora a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, el inóculo fue removido y sustituido por

carboximetil celulosa (CMC) (Sigma-Aldrich. C4888) al 1% en MEM suplementado con 2% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina y se incubaron 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂. Los tiempos de lectura post infección para cada uno de los diferentes virus se muestran en el cuadro 3. Una vez transcurrido el tiempo establecido, se retiró el medio de cultivo y se agregó formalina al 3.7% diluida en PBS en las siguientes cantidades: 200 µl para las placas de 24 hoyos, 100 µl para las placas de 48 hoyos y 50 µl para las placas de 96 hoyos y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retiró la formalina y se agregó cristal violeta al 1% diluida en etanol al 10%, en la misma cantidad que la formalina y se incubó durante 5 minutos. Posteriormente, las placas fueron lavadas con agua destilada y se dejaron secar al aire. Para contabilizar las unidades formadoras de placas (UFP) se utilizó la dilución en la cual las placas fueran contables a simple vista. Los títulos obtenidos para cada uno de los virus se encuentran en el cuadro 3.

Cuadro 3: Títulos virales de cepas utilizadas en los experimentos a los tiempos de lectura determinadas. Las cepas quiméricas se encuentran identificadas con un *

Cepas virales	Tamaño de la placa	Título (UFP/hoyo)	Tiempo de lectura
SLEV*	24 hoyos	1.75x10 ⁶	120 horas
WNV*	24 hoyos	1.75x10 ⁶	120 horas
DENV-1*	48 hoyos	5.0x10 ⁵	120 horas
DENV-2*	48 hoyos	2.3x10 ⁵	120 horas
DENV-3*	48 hoyos	1.0x10 ⁴	120 horas
DENV-4*	48 hoyos	5.0x10 ⁴	120 horas
SLEV *	48 hoyos	8.3x10 ⁵	120 horas
YF 17D	48 hoyos	4.0x10 ⁵	120 horas
WNV*	48 hoyos	2.25x10 ⁶	120 horas
ZIKV	48 hoyos	7.5x10 ⁵	120 horas
SLEV*	96 hoyos	6.2x10 ⁵	72 horas
WNV*	96 hoyos	4.04x10 ⁴	72 horas

5.5. Análisis serológicos: determinación de la seroprevalencia contra WNV en sueros de aves, equinos y seres humanos mediante ensayo de neutralización por reducción de placas (PRNT).

Los sueros de humanos, equinos, aves silvestres y domésticas fueron evaluados para determinar la presencia de anticuerpos contra WNV. Las muestras se incubaron a 56°C por 30 minutos para inactivar el complemento. Inicialmente, los sueros fueron evaluados en un ensayo a una dilución de 1/10 (descrito más adelante 5.5.1) y clasificados en si reaccionaban o no contra WNV. Los que reaccionaron fueron evaluados en un ensayo posterior (ver 5.5.2) para determinar los títulos contra WNV en cada muestra. En ambos casos se utilizó la técnica de reducción de placas la cual se considera el estándar de oro para determinar anticuerpos contra Flavivirus (53, 63, 64).

5.5.1. Clasificación inicial de los sueros por medio del ensayo de neutralización por reducción de placas para determinación de muestras con reacción positiva presuntiva contra WNV

Los sueros de equinos y seres humanos se evaluaron en placas de 48 hoyos siguiendo los protocolos anteriormente descritos (64). Las muestras fueron diluidas 1/5 en MEM con 2% SFB para un volumen final de 150 µl. Las diluciones se realizaron en placas de 96 hoyos (Böttger, 05-011-0100). Seguidamente, la dilución del suero se mezcló con 150 µl del virus de WNV (YFV 17D/WNV Flamingo 383-99) con 20 UFP/hoyo para una dilución final de 10 UFP/hoyo para el virus y 1/10 para el suero. La mezcla se incubó 1 hora a 37 °C con una atmósfera de 5% CO₂. De la mezcla virus-suero, se tomaron 100 µl y se inocularon por duplicado en células VERO (ATCC® CCL-81™), con una confluencia del 100%, se incubó 1 hora a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂. Posterior a esto, el inóculo fue removido y sustituido por 500 µl de MEM suplementado con un 1% de CMC (Sigma-Aldrich. C4888), 2% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina. Las placas se incubaron por 5 días a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo se fijaron por 1 hora con 100 µl de formalina al 3.7% diluida en PBS, luego se tiñeron con 100 µl de cristal violeta al 1% diluida en etanol al 10%. En cada grupo de placas se incluyó un control de células el cual consiste en agregar solamente MEM con un 2% SFB, un control de virus por duplicado (para el 100% de placas) y un control de suero el cual es el suero de un animal previamente vacunado contra WNV.

En el caso de los sueros de las aves, debido a la poca cantidad de suero, el ensayo se llevó a cabo en placas de 96 hoyos, ya que las dos metodologías (en placa de 96 y de 48) son comparables entre sí (65). Los sueros fueron diluidos 1/5 en MEM con 2% de SFB para un volumen final de 30 μ l por muestra. Esta dilución se mezcló con 30 μ l del virus con 20 UFP/hoyo para una dilución final de 10 UFP/hoyo para el virus y 1/10 para el suero. Las diluciones se realizaron en placas de 96 hoyos (Böttger, 05-011-0100). La mezcla se incubó una hora y las posteriores incubaciones se realizaron bajo las mismas condiciones descritas para el ensayo anterior. Seguidamente, se tomaron 50 μ l y se inocularon por duplicado en células VERO (ATCC® CCL-81™). La placa de cultivo se incubó 1 hora. Posteriormente, el inóculo fue removido y sustituido por 100 μ l de MEM suplementado con un 1% de CMC (Sigma-Aldrich. C4888), 2% SFB, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina. Las placas se incubaron 3 días. Luego de este tiempo se fijaron de forma similar descrita anteriormente, únicamente variando los volúmenes de formalina y cristal violeta (50 μ l/hoyo). En cada grupo de placas se incluyó un control de células, control de virus (por duplicado) y un control de suero, igual al ensayo anterior.

Para realizar el cálculo del porcentaje de neutralización, se contaron las placas de los controles virales y se calculó el promedio de unidades formadoras de placas (UFP). El número de placas se consideró el 100%. Luego se comparó con cada suero para calcular el porcentaje de inhibición de la muestra. A los sueros se les clasificó en tres categorías de acuerdo con el porcentaje de neutralización contra WNV: neutralización total ($\geq 90\%$), neutralización parcial ($< 89\%$) y no neutralización. Los que se clasificaron como neutralización total fueron seleccionados para realizar una titulación contra los diferentes Flavivirus.

5.5.2. Titulación de sueros positivos contra distintos Flavivirus para descartar positividad a WNV por posibles reacciones cruzadas

Los sueros clasificados como “neutralización total” fueron analizados contra algunos de los diferentes Flavivirus circulantes en el país. En el caso de los equinos y las aves la titulación se realizó para los virus de WNV (YFV 17D/WNV Flamingo 383-99) y SLEV (SLEV CorAn9124) debido a que son los agentes más probables en estos animales. En el caso de los seres humanos además se utilizaron los virus de DENV (YFV 17D/ DENV-1 PUO 359, YFV 17D/DENV-2 218, YFV 17D/DENV-3 PaH881/88, YFV 17D/DENV-4 1228), ZIKV

(H/PP/2013), YFV (YFV 17D) debido a la circulación de estos virus en el país y la posibilidad de que alguna persona estuviese vacunada contra YFV.

Los sueros de humanos y equinos se evaluaron en placa de 24 hoyos. A estos se les realizó una dilución inicial de 1/10 en MEM con 2% SFB (810 µl de MEM con 90 µl de suero), de la cual se realizaron diluciones seriadas base 2. Las diluciones se llevaron a cabo en placa de 96 hoyos (Böttger, 05-011-0100) A cada una de las diluciones se les agregó 40 UFP/hoyo en un volumen igual al del suero (225 µl por hoyo). Para diluciones finales del suero de 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640. En el caso del virus la dilución final contra cada suero fue de 20 UFP/hoyo. Los sueros equinos se iniciaron en la dilución 1/40 y se realizó una dilución adicional de 1/1280 debido a que en ensayos iniciales presentaron títulos superiores a 1/640.

La mezcla virus-suero se incubó 1 hora a 37°C, con una atmósfera de 5% CO₂. Seguidamente, se tomaron 200 µl y se inocularon por duplicado en células VERO (ATCC® CCL-81™) con una confluencia del 100% y se incubó durante una hora a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂. Posteriormente, el inóculo fue removido y sustituido por 500 µl MEM suplementado con un 1% de CMC, (Sigma-Aldrich. C4888), 2% SFB, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina. Las placas se incubaron por 5 días a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo se fijaron igual que las descritas anteriormente.

Los sueros de las aves fueron evaluados en placa de 96 hoyos. Al suero se le realizó una dilución inicial de 1/10 en MEM con 2% SFB (98 µl de MEM con 12 µl de suero). Las diluciones se realizaron en placas de dilución de 96 hoyos (Böttger, 05-011-0100) A cada dilución se le agregó 40 UFP/hoyo (30 µl por hoyo) para una dilución final de 20 UFP/hoyo. Las diluciones seriadas finales fueron similares a las anteriores al igual que las condiciones de incubación. La mezcla virus-suero se incubó una hora, seguidamente se tomaron 50 µl y se inocularon por duplicado en células VERO (ATCC® CCL-81™), se incubó nuevamente una hora y posteriormente el inóculo fue removido y sustituido por 100 µl de MEM suplementado con un 1% de CMC (Sigma-Aldrich. C4888), 2% SFB, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina. Las placas se incubaron 72 horas, transcurrido este tiempo se fijaron y tiñeron similar a las descritas anteriormente.

En cada grupo de placas se incluyó un control de células el cual consiste en agregar solamente MEM con un 2% SFB, un control de virus (por duplicado) y los controles de suero. Para el control de suero contra WNV se utilizó el suero de un animal vacunado, para los DENV se utilizó un pool de sueros positivos de humanos y para SLEV pool de sueros positivos de equinos (confirmados por otras técnicas), en el caso de ZIKV y YFV se utilizó un suero positivo de ser humano (evaluado por otra técnica).

Después de la tinción con cristal violeta, se contó las UFP en los controles virales y se calculó el promedio, el cual se considera el 100%. Basado en este número se calculó el porcentaje de inhibición. Además, se revisan los controles celulares y los de suero que no debían presentar placas (control de sueros). Para el punto final de la titulación se consideró la dilución más alta en la cual la neutralización sea $\geq 90\%$ del promedio de formación de placas del control viral (PRNT $\geq 90\%$). Las muestras de suero que presentan una neutralización con cuatro diluciones de diferencia respecto a otro virus se consideran positivas (con anticuerpos específicos contra ese virus). En caso de que no se presenten estas cuatro diluciones de diferencia, el suero se considera positivo para anticuerpos contra Flavivirus (Flavivirus positivo).

5.6. RT-PCR para evaluar la presencia de ARN de Flavivirus en muestras de aves y mosquitos

Para realizar los RT-PCR de aves se utilizó un macerado del total de los órganos (pool de órganos) (32). En el caso de los mosquitos los especímenes se agruparon en pools de máximo 20 individuos basados en especie y trampa (66, 67).

Para la extracción de ARN se utilizó el método de TRIzol® (Ambion, 15596018) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De acuerdo con el protocolo se utilizó un máximo de 100 mg de tejido en el caso de las aves y para los mosquitos un máximo de 20 especímenes. En ambos casos la muestra fue macerada con ayuda de un pistilo en un vial de 1.5 mL. Seguidamente se les agregó un 1 mL TRIzol® (Ambion, 15596018) frío y se agitó en un agitador vórtex para luego ser incubadas a temperatura ambiente por 10 min. A continuación, a cada vial se le agregaron 200 μ l de cloroformo grado molecular (Sigma-Aldrich, 516726) frío y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron en frío 15 min a 14 000 rpm.

Posteriormente, se transfirió la fase transparente a un nuevo vial, el cual contenía 2 μ l de GlycoBlue™ (15 mg/mL) (Invitrogen, AM9515) y 500 μ l de isopropanol grado biología molecular (Sigma-Aldrich, I9516), se agitó por pipeteo y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó en frío por 10 min a 14 000 rpm. El líquido se decantó conservando solamente el botón, a éste se le agregó 1 mL de etanol grado biología molecular (Sigma-Aldrich, E7023) al 70% y se agitó para lavarlo. La muestra se centrifugó en frío por 5 min a 10 000 rpm. El líquido nuevamente se decantó y el botón se dejó secar al aire por 10 min. Luego se le agregaron 60 μ l de agua DEPC (Thermo Scientific, R0581) y se incubó en 56 °C por 15 min.

Seguidamente, se realizó la reacción de retrotranscripción (RT) por medio del kit Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific cat K1622), siguiendo las instrucciones del fabricante tanto para la mezcla como el protocolo de temperaturas. La reacción consiste en 4 μ l de buffer de reacción 5x, 1 μ l del inhibidor de RNasa RiboLock, 2 μ l de dNTP's, 1 μ l de la enzima de retrotranscripción RevertAid, 1 μ l de hexámeros aleatorios como cebadores y 11 μ l de ARN con una concentración entre 0.1 ng a 5 μ g de ARN para un volumen final de 20 μ l. La concentración de ARN se calculó mediante espectrofotometría (NanoDrop™ 2000) siguiendo las instrucciones del equipo. La mezcla se llevó al termociclador con el siguiente protocolo: 25 °C 5 min, 42 °C 60 min y 72 °C 5 min. El control positivo de extracción para esta reacción es el incluido en dicho kit (ARN GAPDH) y como control negativo se utilizó agua DEPC.

Una vez finalizada la reacción RT, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semi-anidada en la cual se analizaron las muestras para la presencia de Flavivirus. Para cada muestra se utilizaron las siguientes cantidades: 12.5 μ l de DreamTaq 2x master mix (Thermo Scientific, K1072), 0.625 μ l del cebador antisentido cFD2 (10 mM), 0.625 μ l del cebador sentido MAMD (10 mM), 9.25 μ l de agua DEPC (Thermo Scientific, R0581) y 2 μ l de la reacción de RT previa para un volumen final por reacción de 25 μ l. Las secuencias de los cebadores y la posición en el genoma se muestran en el cuadro 4. Para la segunda reacción se utilizaron 2 μ l de la primera reacción con las mismas cantidades de reactivos descritas antes, solamente se cambió el cebador MAMD por el cebador FS778. Este PCR interroga la región NS5 la cual es una de las proteínas estructurales más conservadas de los Flavivirus (68). Como control positivo se utilizó una cepa de DENV-1 (Angola D1/AO/XX/1988) y agua DEPC (Thermo Scientific, R0581) como control negativo.

Cuadro 4: Cebadores utilizados para la detección de Flavivirus en muestras de aves y mosquitos. La posición en el genoma corresponde a la secuencia del virus 17D YF (número de acceso en GenBank X03700) (68).

Nombre del cebador	Secuencia de cebador 5´-3´	Posición en el genoma	Peso de producto esperado en pb
MAMD	AACATGATGGGAAARAGRGARAA	9006-9029	250
cFD2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	9232-9258	
FS778	AARGGHAGYMC DGCHATH TGGT	9046-9070	210

Las condiciones para la reacción de PCR que se utilizaron con los cebadores cFD2-MAMD fueron las siguientes: 95 °C 5 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min y una extensión final de 72 °C 10 min (68). Las condiciones para la reacción anidada (cFD2-FS778) fueron las siguientes 95 °C 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min y una extensión final de 72 °C 10 min (68).

Los productos fueron analizados por electroforesis capilar mediante el QIAxcel Advance (Qiagen) y el programa Qiaxcel ScreenGel v1.6. Para cada corrida se utilizó el cartucho "QIAxcel DNA screening gel" (Qiagen, 929004), con los siguientes parámetros de corrida: marcador de alineamiento de 15-3000 pb (Qiagen, 929522), un marcador de peso molecular de 50 – 1500 pb (Qiagen, 929554) y el método AM420 (A: separación de ADN, M: 10 s de inyección con un voltaje de 5kV, 420: tiempo de separación de 420 s a un voltaje de 5kV). La banda esperada es de 220 pb (68).

Las muestras que resultaron positivas se purificaron mediante el reactivo para limpieza de productos de PCR ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems, 78201) siguiendo las instrucciones del fabricante. A cada reacción de PCR con un volumen final de 25 µl se le agregó 10 µl de ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems, 78201). A continuación, se incubó a 37 °C por 15 minutos, seguido de 15 minutos a 80 °C. Los productos fueron secuenciados mediante la técnica Sanger en los laboratorios de MacroGen Inc (<https://dna.macrogen.com/esp/>). Las secuencias se analizaron mediante el programa de uso libre MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>) (69) y fueron comparadas en la base de datos públicos

“nucleotide-nucleotide basic alignment search tool” (BLASTn) (National Center for Biotechnology Information, USA, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A las muestras que fueron identificadas como positivas se les realizó un RT-PCR anidado específico para WNV, el cual amplifica una parte de la región de envoltura la cual es usada para la clasificación de los diferentes linajes (70). Para cada reacción se utilizaron las siguientes cantidades 12.5 µl de DreamTaq 2x máster mix (Thermo Scientific, K1072), 0.5 µl del cebador sentido 1401 (10 mM), 0.5 µl del cebador antisentido 1845 (10 mM), 9.5 µl de agua DEPC y 2 µl de la reacción de RT previa para un volumen final por reacción de 25 µl. Para el segundo PCR se utilizaron 2 µl de la primera reacción y se utilizan los cebadores 1485 y 1732 con las mismas cantidades de la mezcla previa (70). Las secuencias de los cebadores y el producto esperado de 248 pb se muestran en el cuadro 5. En este caso se utilizó como control positivo la cepa de WNV YFV 17D/WNV Flamingo 383-99 y como control negativo agua DEPC (Thermo Scientific, R0581).

Cuadro 5: Cebadores utilizados para la detección de WNV en muestras de aves y mosquitos. La posición en el genoma corresponde a la secuencia de la cepa NY99-flamingo 382-99 (número de acceso en GenBank AF196835.2) (70).

Nombre del cebador	Secuencia 5´-3´	Posición en el genoma	Peso del producto esperado en pb
1401	ACCAACTACTGTGGAGTC	1401-1845	445
1845	TTCCATCTTCACTCTACACT		
1485	GCCTTCATACACACTAAAG	1485-1732	248
1732	CCAATGCTATCACAGACT		

Las condiciones para la reacción de PCR que se utilizaron para ambos juegos de cebadores fueron las siguientes: 95 °C 11 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 60 s y una extensión final de 72 °C 5 minutos. El análisis del producto mediante electroforesis capilar, la purificación de los productos positivos y sus respectivos análisis se realizaron como se describió anteriormente.

5.7. Determinación de preferencias de alimentación en hembras grávidas por medio de PCR y secuenciación del citocromo oxidasa subunidad 1 (COI)

Las hembras grávidas con sangre obvia que fueron colectadas mediante las trampas tipo CDC con CO₂ fueron clasificadas a nivel de especie y se procesaron de manera individual para determinar sus preferencias de alimentación mediante la secuenciación de parte del citocromo oxidasa subunidad 1 (COI 1), así como la presencia de Flavivirus mediante RT-PCR (sección 5.6) (68, 71).

A los mosquitos se les realizó una extracción de ADN-ARN mediante un kit comercial NucleoSpin® TriPrep (catálogo 740966.50, Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. El mosquito fue macerado con la ayuda de un pistilo en un vial de 1.5 mL. Seguidamente, se agregaron 350 µl de buffer de lisis RP1 y 3.5 µl de β-mercaptoetanol y se agitó mediante un agitador vórtex. La totalidad de la muestra fue transferida a una columna de filtración NucleoSpin® Filter y se centrifugó por 1 min a 11 000 rpm. Al filtrado se le agregaron 350 µl de etanol grado biología molecular al 70% (Sigma-Aldrich, E7023) y se homogenizó por pipeteo. La mezcla fue transferida a una columna NucleoSpin® TriPrep y se centrifugó por 30 s a 11 000 rpm. A la columna, se le agregaron 500 µl de “DNA wash” para eliminar las sales caotrópicas y se centrifugó por 1 min a 11 000 rpm, se realizó un segundo lavado de la misma manera. Luego, se dejó secar la columna por 3 minutos. Finalmente, para eluir el ADN se agregaron 100 µl de “DNA elute” se incubó 1 minuto y se centrifugó 1 minuto a 11 000 rpm.

La extracción de ARN de los mosquitos se llevó a cabo con el fin de analizar la presencia de Flavivirus. Para esto se preparó una solución de digestión del ADN. En un vial se agregaron para cada reacción 10 µl de rDNase y 90 µl de buffer de reacción para la rDNase, se mezcló por pipeteo. A cada columna se le dispensó 95 µl de la mezcla y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se añadió 200 µl del buffer de lavado RA2 y se centrifugó por 30 s a 11 000 rpm. Luego, se realizó un lavado de la membrana con 600 µl de buffer RA3 para inactivar las rDNase, se centrifugó por 30 s a 11 000 rpm, el lavado se repitió con 250 µl de buffer de lavado RA3 y se centrifugó por 2 minutos a 11 000 rpm. Seguidamente, se eluyó el ARN con 60 µl de agua libre de RNasas (incluida en el kit). La concentración y la pureza del ARN se calculó mediante espectrofotometría (NanoDrop™ 2000) siguiendo las instrucciones del equipo. Estas

muestras fueron procesadas para la reacción de RT y de PCR como se describió anteriormente (sección 5.6)

A las muestras de ADN se les realizó un PCR anidado para la región citocromo oxidasa subunidad I (COI) utilizando los cebadores del cuadro 6 (71). Las reacciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: 12,5 µl de DreamTaq 2x máster mix (Thermo Scientific, K1072), 1 µl del cebador sentido COI_long (f) (10 mM), 1 µl del cebador antisentido COI_long (r), 7.5 µl de agua DEPC y 3 µl de ADN. Para la reacción anidada se utilizó 25 µl de DreamTaq 2x master mix (Thermo Scientific, K1072), 1 µl del cebador sentido COI_short (f) (10 mM), 1 µl del cebador antisentido COI_short (r) (10 mM), 20 µl de agua DEPC y 3 µl de la primera reacción (71). El protocolo para llevar a cabo ambas reacciones de PCR fue el siguiente: 95 °C 1 minuto, seguido por 35 ciclos de 95 °C 30 s, 50 °C por 50 s, 72 °C por 60 s y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Cuadro 6: Cebadores utilizados para la identificación de preferencias de alimentación mediante un fragmento de COI. Las posiciones en el genoma están basadas en una secuencia de *Homo sapiens sapiens* (número de acceso en GenBank AF346980)(71)

Nombre del cebador	Secuencia 5´-3´	Posición en el genoma	Peso de producto esperado en pb
COI_long (f)	AACCACAAAGACATTGGCAC	5934-6597	663
COI_long (r)	AAGAATCAGAATARGTGTTG		
COI_short (f)	GCAGGAACAGGWTGAACCG	6267-6591	324
COI_short (r)	AATCAGAAAYAGGTGTTGGTATAG		

El análisis de las muestras, purificación y la reacción de secuenciación se realizaron igual a las descritas anteriormente. Las muestras se consideraron como “identificada” cuando presentaban al menos un 95% de identidad (porcentaje de identidad de nucleótidos) con alguna secuencia depositada en GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Cuando las muestras presentaban similitud con más de una especie, se tomó en cuenta para la selección el rango geográfico, porcentajes de similitud y la abundancia de esa especie (71).

5.8. Análisis estadístico

La relación entre el sexo del animal y la seropositividad a WNV se evaluó mediante una prueba de Chi-cuadrado. Además, se realizó una prueba de coeficiente de correlación de Spearman entre la edad y la seropositividad, así como entre la edad y los sueros que fueron Flavivirus positivos con un $\alpha = 0.005$. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa Excel, Microsoft.

6. Resultados

6.1. Numerosas muestras de aves, equinos, mosquitos y seres humanos fueron recolectadas en las 8 unidades habitacionales en los dos sitios que se utilizaron para los análisis.

El estudio se llevó a cabo en dos localidades con antecedentes de enfermedad neurológica en equinos asociada con WNV (Figura 1) (45). El primer lugar de muestreo fue la zona de Cuajiniquil, distrito 6 del cantón de Santa Cruz (10°15'06 N, 85° 41'07 O), Guanacaste (Figura 2). La segunda zona de estudio fue Talamanca (9°37'14.99'N, 82° 50'39.98 O) cantón 4 de la provincia de Limón (Figura 3). En cada sitio se escogieron y muestrearon 8 unidades habitacionales que cumplían los requisitos anteriormente expuestos (sección 5.1) Las colectas se realizaron en dos períodos del año: época lluviosa y época seca. La región Caribe Sur a la cual pertenece Talamanca no presenta una época seca marcada sino más bien una época de disminución de lluvias, en el caso de este trabajo a esta época se le denominará época seca para conservar la nomenclatura. El objetivo de realizar dos muestreos era determinar si se daban eventos de seroconversión entre las dos épocas. La época de mayor circulación de los arbovirus endémicos como DENV y Encefalitis Equina Venezolana es la época lluviosa (45, 72).

Cada unidad habitacional se designó con la letra "C", seguido de las iniciales del cantón: SC (Santa Cruz) y TA (Talamanca), luego en orden alfabético (A-O) según se realizaron las visitas (cuadro 7).

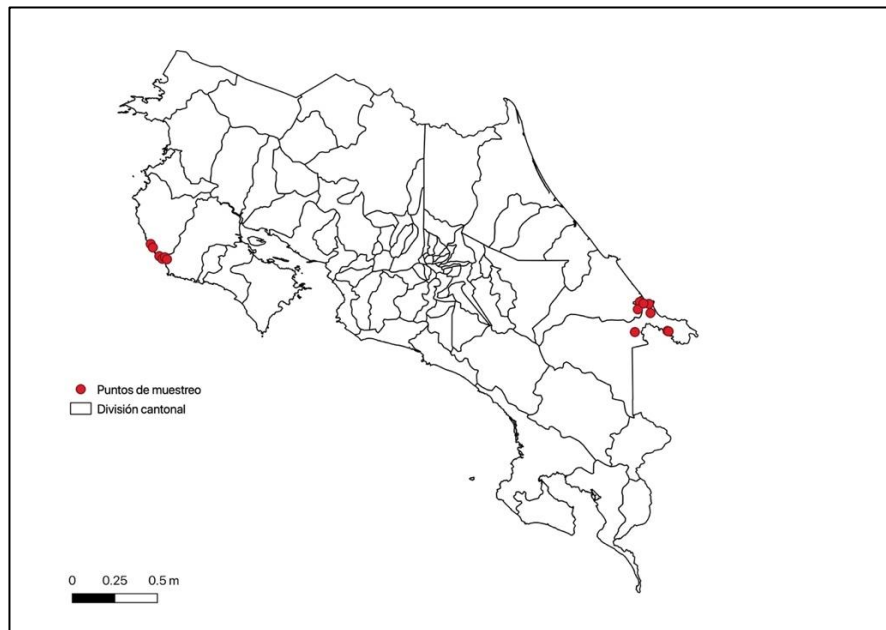


Figura 1: Mapa de Costa Rica con la distribución geográfica de las 16 unidades habitacionales muestreadas en los cantones de Talamanca y Santa Cruz. Cada punto representa una unidad habitacional (Software QGIS versión 3.6)

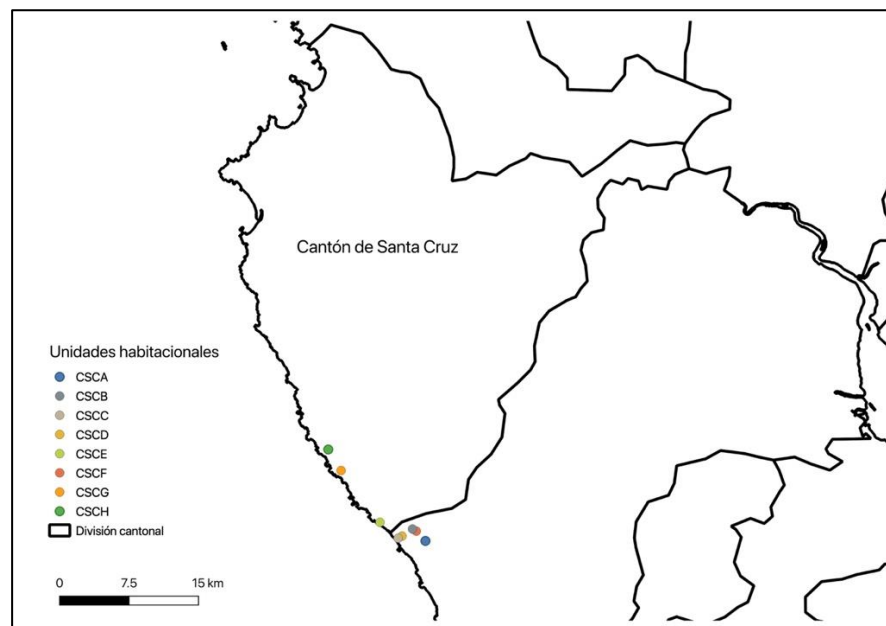


Figura 2: Mapa del cantón de Santa Cruz, Guanacaste, con la distribución geográfica de las 8 unidades habitacionales en las cuales se realizó el muestreo en la zona de Cuajiniquil. Cada punto representa una unidad habitacional (Software QGIS versión 3.6)

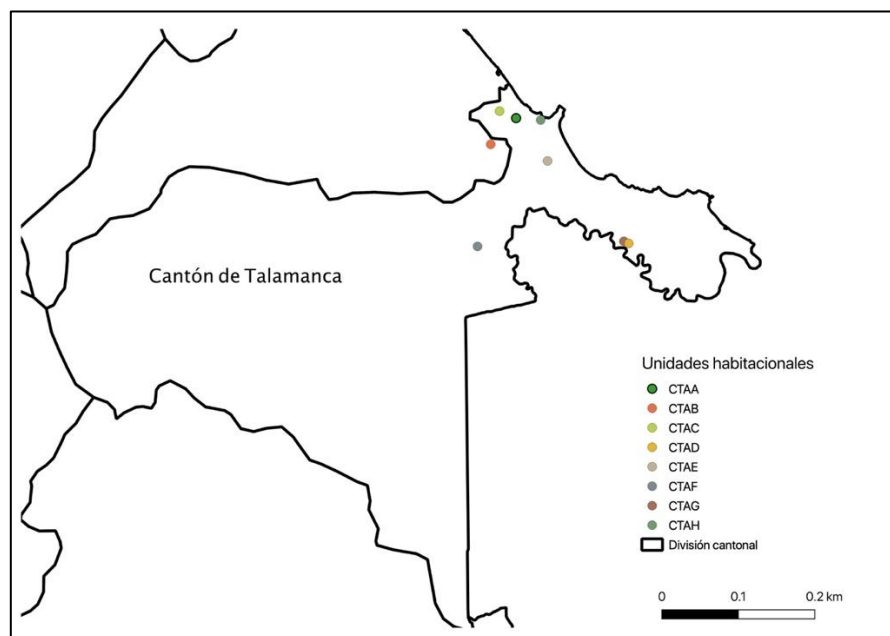


Figura 3: Mapa del cantón de Talamanca, Limón, con la distribución geográfica de las 8 unidades en la cuales se realizó el muestreo. Cada punto representa una unidad habitacional.

Cuadro 7: Identificación de las unidades habitacionales para los muestreos de época seca y lluviosa. La unidad habitacional CTAG no se pudo muestrear en la segunda ocasión. NR: no realizado

Cuajiniquil		Talamanca	
Época lluviosa	Época seca	Época lluviosa	Época seca
CSCA	CSCI	CTAA	CTAI
CSCB	CSCJ	CTAB	CTAJ
CSCC	CSCK	CTAC	CTAL
CSCD	CSC L	CTAD	CTAK
CSCE	CSCM	CTAE	CTAN
CSCF	CSCN	CTAF	CTAM
CSCG	CSCP	CTAG	NR
CSCH	CSCO	CTAH	CTAO

Las visitas a la zona de Cuajiniquil se llevaron a cabo entre julio a noviembre 2017 para la época lluviosa y para la época seca entre febrero y abril 2018. La cantidad de muestras colectadas se encuentran resumidas en el cuadro 8. El muestreo correspondiente a época seca tuvo una disminución del número de equinos debido a que la tormenta tropical Nate, afectó gravemente a la comunidad (La Voz de Guanacaste, <https://vozdeguanacaste.com/marbella-ostional-y-san-juanillo-estan-sin-agua-electricidad-e-internet/>. Revisado el 29 de julio de 2019). El número de personas también declinó debido a que algunas decidieron no participar en la segunda parte del estudio. En el caso de las aves, se obtuvo un aumento en el éxito de captura para un total de 36 aves, además de suero de 3 gallinas.

Cuadro 8: Cantidad y tipo de muestra obtenida en la zona de Cuajiniquil en los dos periodos de colecta. *El total de muestras solo incluye los pools de mosquito.

Especie	Tipo de muestra	Época Lluviosa (n)	Época seca (n)
Equinos	Sueros	86	57
Aves	Tejidos	16	36
	Sueros	14	35
Humanos	Sueros	16	12
Mosquitos	Pools	119	44
	Individuos	377	177
	Hembras	9	3
	Grávidas		
Gallinas domésticas	Sueros	29	3
Total de muestras*		289	187

Los muestreos en el cantón de Talamanca se llevaron a cabo entre julio-agosto 2018 correspondiente a la época lluviosa y entre setiembre y noviembre 2018 para la época seca. La distribución de las muestras se resume en el cuadro 9.

Cuadro 9: Cantidad y tipo de muestras obtenidas en la zona de Talamanca en los dos periodos de colecta. *El total solo incluye los pools de mosquitos.

Especie	Tipo de muestra	Época lluviosa (n)	Época seca (n)
Equinos	Sueros	20	16
Aves	Tejidos	60	28
	Sueros	52	27
Humanos	Sueros	17	15
Mosquitos	Pools	133	66
	Individuos	573	246
	Hembras grávidas	17	5
Gallinas	Sueros	7	0
Total de muestras*		306	157

Sitios de muestreo y cantidad de muestras colectadas:

- Los muestreos se llevaron a cabo en Cuajiniquil y Talamanca tanto en época seca como lluviosa
- Se utilizaron 8 unidades habitacionales donde se tomaron muestras de aves, equinos, mosquitos y seres humanos
- Se colectaron un total de 179 sueros equinos, 140 muestras de aves silvestres. (128 sueros), 60 sueros de seres humanos, 1373 mosquitos y 34 hembras grávidas

6.2. Un total de 140 aves y 1373 mosquitos se colectaron y fueron clasificados por especie.

Un total de 140 aves fueron capturadas durante el periodo de estudio. En el área de Cuajiniquil se logró capturar 51 aves (cuadro 10), 17 en la época lluviosa y 36 en la época seca. Las aves capturadas se clasificaron en 15 especies diferentes, correspondientes a 4 órdenes. El 40.6% (n=13) de las aves capturadas corresponden a *Columbina inca*, seguido por *Campylorhynchus rufinucha* con un 21.9% (n=7). Dos especies corresponden a especies migratorias: *Geothlypis philadelphia* y *Vireo flavoviridis*. En la zona de Talamanca se colectó un total de 88 aves, correspondientes a 29 especies diferentes agrupadas en 6 órdenes (Cuadro 11). Del total de aves capturadas 61 fueron obtenidas en la época lluviosa y 27 en la época seca. El 26.1% (n=23) de las especies corresponden a *Sporophila*

torqueola. Seis de las especies correspondían a especies migratorias, esto se debe a que la zona se encuentra en la ruta de migración de las aves hacia América del Sur (73). Las especies migratorias corresponden a *Piranga rubra*, *Parkesia noveboracensis*, *Catharus ustulatus*, *Empidonax alnorum*, *Empidonax virescens*, *Vireo flavifrons*.

Cuadro 10: Clasificación de las aves capturadas en Cuajiniquil por orden, género y especie para cada unidad habitacional en las distintas épocas de muestreo

Orden	Familia	Especie	N	Casa	n época lluviosa	n época seca	Migratoria
Apodiformes	Trochilidae	<i>Amazilia rutila</i>	5	A, E, K, N	3	2	No
Coraciiformes	Momotidae	<i>Eumomota superciliosa</i>	1	I	1	0	No
Columbiformes	Columbidae	<i>Columbina inca</i>	13	A, C, I, J, L, M	2	11	No
Passeriformes	Fringillidae	<i>Euphonia hirundinacea</i>	1	A	1	0	No
	Icteridae	<i>Icterus pustulatus</i>	3	M	0	3	No
	Icteridae	<i>Quiscalus mexicanus</i>	3	I, K	0	3	No
	Parulidae	<i>Geothlypis philadelphia</i>	1	M	0	1	Si
	Passerellidae	<i>Aimophila ruficauda/Peucaea ruficauda</i>	3	A	3	0	No
	Poliotilidae	<i>Poliotila plumbea</i>	1	C	1	0	No
	Rhinocryptidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	4	B, I, K	1	3	No
	Troglodytidae	<i>Campylorhynchus rufinucha</i>	7	H, K, L, M, N	3	4	No
	Troglodytidae	<i>Thryophilus pleurostictus</i>	1	N	0	1	No
	Turdidae	<i>Turdus grayi</i>	3	D, J	2	1	No
	Tyrannidae	<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	3	N	0	3	No
	Vireonidae	<i>Vireo flavoviridis</i>	2	M	0	2	Si
Total			51		17	34	

Cuadro 11: Clasificación de las aves capturas en Talamanca por orden, familia y especie para cada unidad habitacional en las distintas épocas de muestreo

Orden	Familia	Especie	N	Casa	n época lluviosa	n época seca	Migratoria
Caprimulgiformes	Caprimulgidae	<i>Nyctidromus albicollis</i>	1	A	1	0	No
Columbiformes	Columbidae	<i>Patagioenas flavirostris</i>	1	I	0	1	No
Coraciiformes	Alcedinidae	<i>Chloroceryle amazona</i>	1	C	1	0	No
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	4	A, F, N	2	2	No
Passeriformes	Cardinalidae	<i>Habia fuscicauda</i>	3	C	3	0	No
		<i>Piranga rubra</i>	1	L	0	1	Si
	Fringillidae	<i>Euphonia luteicapilla</i>	1	F	1	0	No
	Furnariidae	<i>Dendrocincla fuliginosa</i>	2	E, N	1	1	No
		<i>Xiphorhynchus erythrogygius</i>	1	C	1	0	No
		<i>Xiphorhynchus susurrans</i>	1	J	0	1	No
	Parulidae	<i>Parkesia noveboracensis</i>	2	L, O	0	2	Si
	Thraupidae	<i>Sporophila funerea</i>	1	E	1	0	No
		<i>Ramphocelus passerinii</i>	2	A	2	0	No
		<i>Sporophila torqueola</i>	23	A, E, I, O	17	6	No
	Troglodytidae	<i>Troglodytes aedon</i>	3	E, F, H	3	0	No
	Turdidae	<i>Catharus ustulatus</i>	1	J	0	1	Si
		<i>Turdus grayi</i>	3	A, B, L	2	1	No
	Tyrannidae	<i>Empidonax alnorum</i>	1	L	0	1	Si
		<i>Empidonax virescens</i>	4	J, L, M	0	4	Si
		<i>Mionectes oleagineus</i>	1	E	1	0	No
		<i>Myiozetetes similis</i>	7	F, H, O	6	1	No
		<i>Pitangus sulphuratus</i>	4	A, I	2	2	No
		<i>Todirostrum cinereum</i>	1	E	1	0	No
<i>Tyrannus melancholicus</i>		2	A	2	0	No	
Vireonidae	<i>Vireo flavifrons</i>	1	A	1	0	Si	
Trochiliformes	Trochilidae	<i>Glaucis aeneus</i>	4	B, D, E	4	0	No
		<i>Amazilia tzacatl</i>	8	A, B, C, D, N, O	6	2	No
		<i>Phaethornis longirostris</i>	2	E, F	2	0	No
		<i>Phaethornis striigularis</i>	2	C, K	1	1	No
Total			88		61	27	

En el caso de los mosquitos, un total de 1373 mosquitos fueron capturados en 128 noches trampa. Posteriormente se realizaron los pools basados en la trampa y especie con un máximo de 20 individuos por pool. Esta clasificación se llevó a cabo mediante las claves de Darsie, 1993 y Vargas, 1998, por personal del Laboratorio de Investigación en Vectores, Universidad de Costa Rica (58, 60).

En el caso de la zona de Cuajiniquil se obtuvieron 199 pools (con un total de 377 individuos) para la época lluviosa y 44 pools (con un total de 177 individuos) para la época seca. La distribución por especie y época se muestra en las figuras 4 y 5.

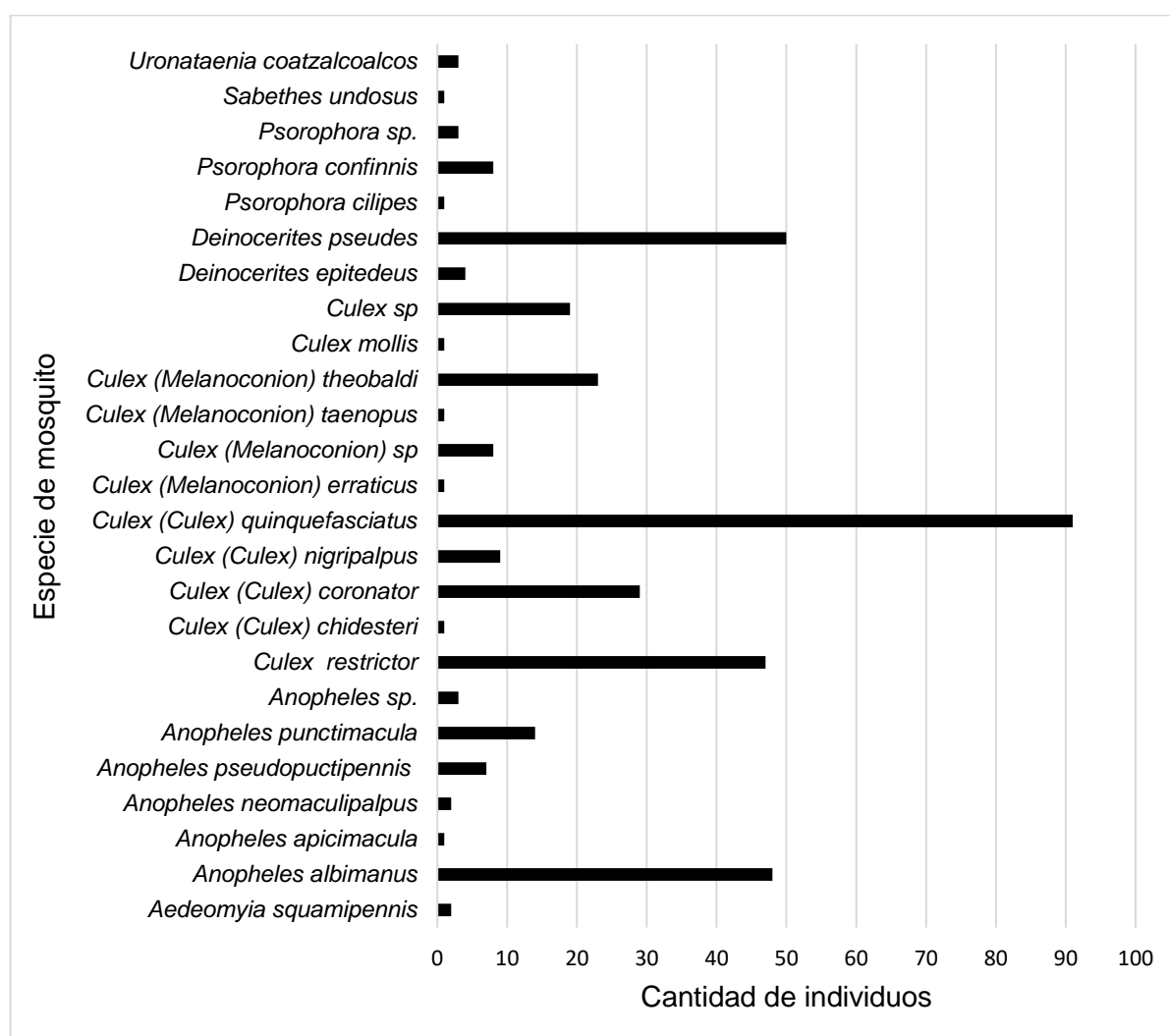


Figura 4: Distribución de las especies de mosquitos en la época lluviosa en la zona de Cuajiniquil en el periodo comprendido entre julio – noviembre, 2018.

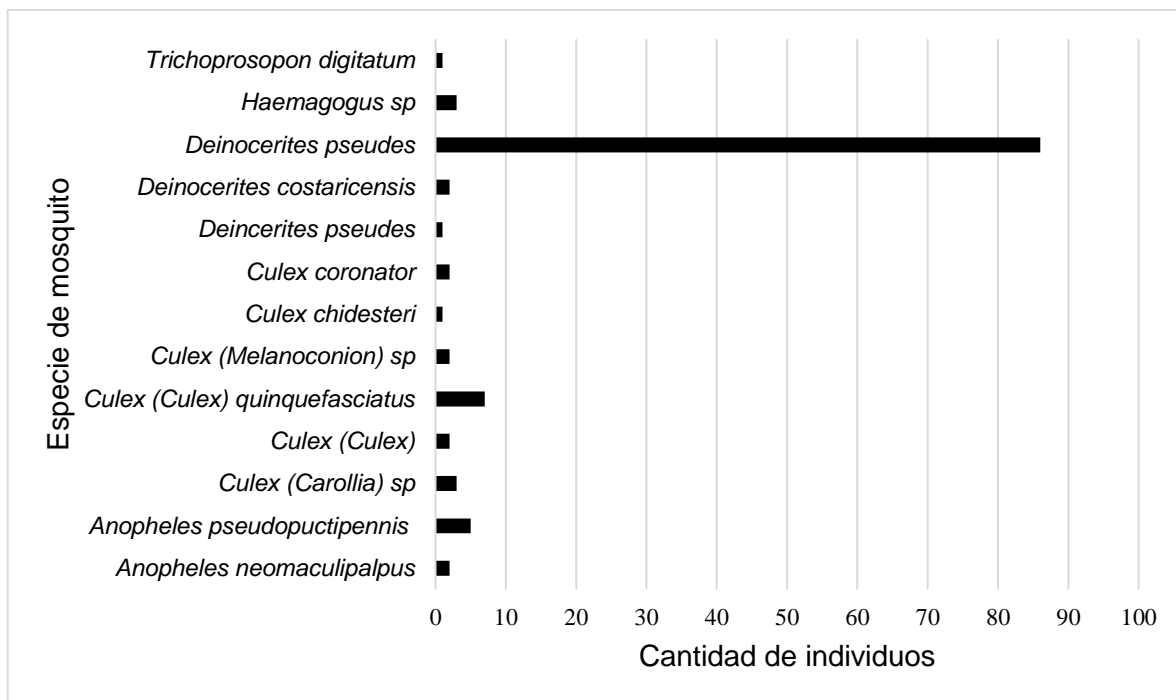


Figura 5: Distribución de las especies de mosquitos en la época seca en la zona de Cuajiniquil en el periodo comprendido entre febrero – abril, 2018.

Para la zona de Talamanca se obtuvieron 133 pooles (con un total de 573 individuos) en la época lluviosa y 66 pooles (con un total de 246 individuos) para la época seca. La distribución por especie y época se muestra en las figuras 6 y 7.

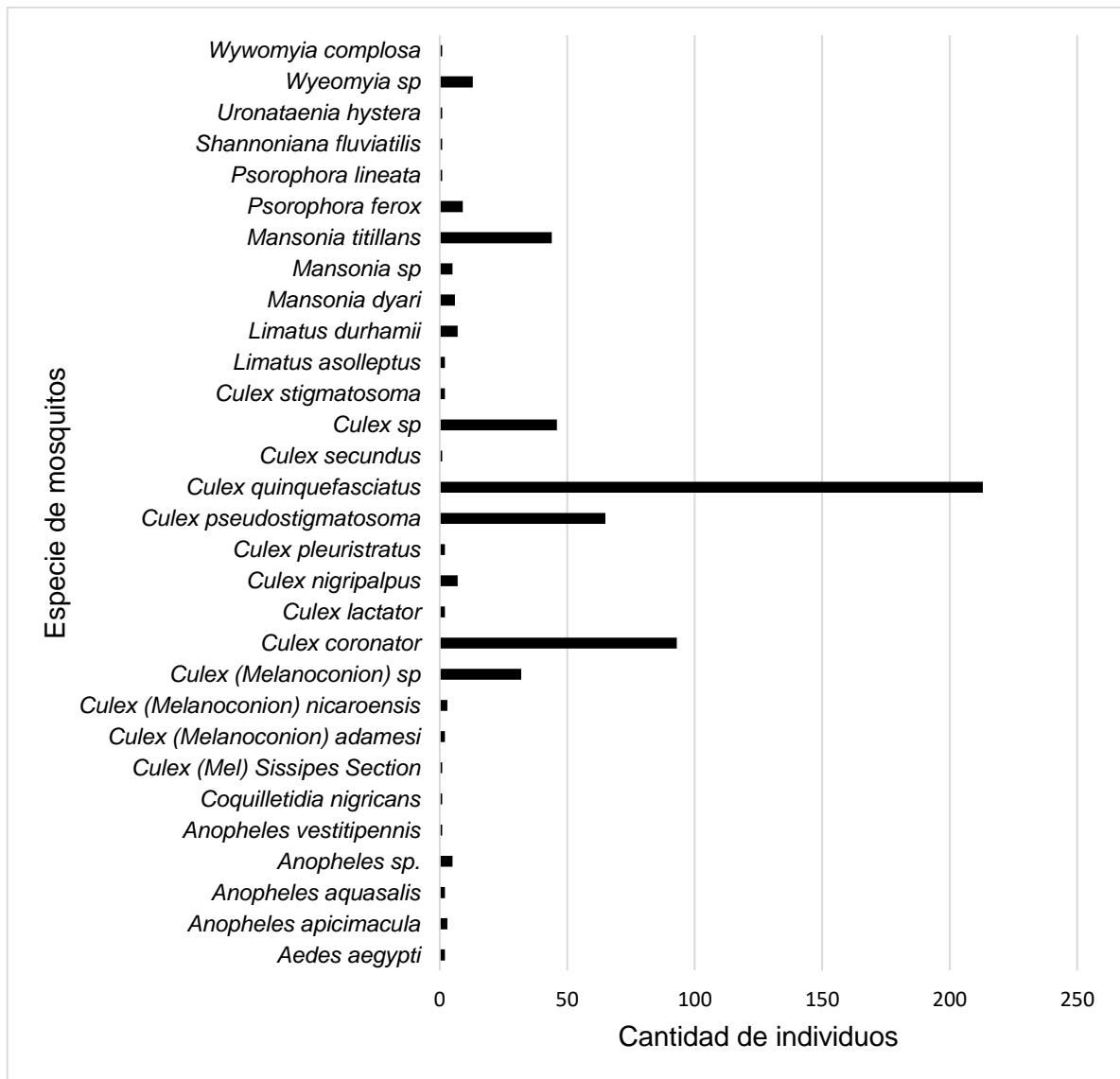


Figura 6: Distribución de las especies de mosquitos en la época lluviosa en la zona de Talamanca en el periodo comprendido entre julio – agosto 2018

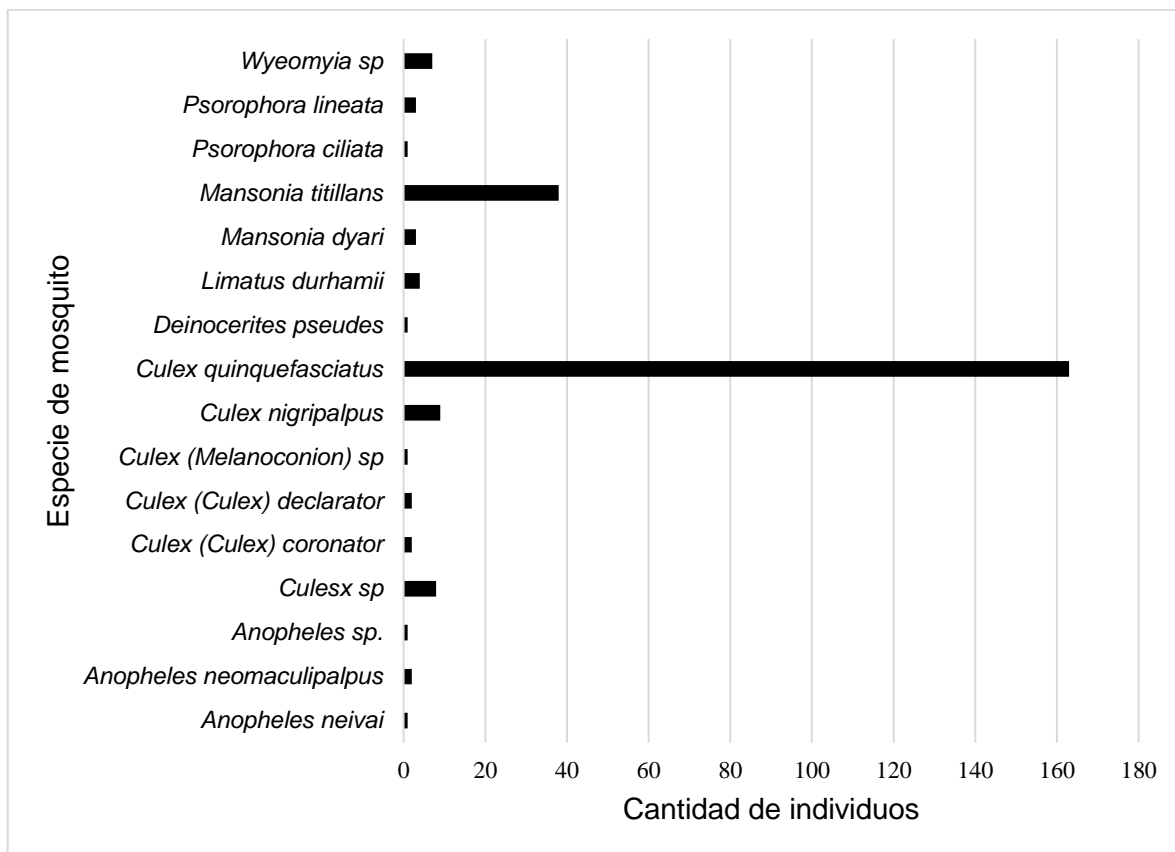


Figura 7: Distribución de las especies de mosquitos en la época seca en la zona de Talamanca en el periodo comprendido entre setiembre – noviembre 2018.

Al realizar la clasificación por especie se determinó que en ambas zonas la especie *Cx. quinquefasciatus* fue una de las más representativas. En la zona de Cuajiniquil en la época lluviosa el 24.13% de las especies colectadas se identificaron como *Cx. quinquefasciatus*, mientras que en la época seca el 5.98%. En la zona de Talamanca en época lluviosa representó el 37.17% del total de mosquitos colectados y en la época seca el 66.20%. Este mosquito se ha asociado en Norte América como uno de los principales vectores junto con *Cx nigripalpus* (el cual también se identificó pero en menor cantidad) de WNV (29, 33, 37).

La distribución por zona de captura se muestra en las figuras 8 y 9. En ambas zonas en la época lluviosa, la trampa con mayor éxito de captura es la denominada “bosque”, seguida por la trampa “intradomiciliar”. A pesar de que la cantidad de mosquitos disminuyó en la época seca, la trampa “bosque” en la zona de Cuajiniquil continúa siendo la más exitosa.

Sin embargo, para la zona de Talamanca en la época seca la trampa “intradomiciliar” desplaza a la trampa “bosque” en éxito de captura.

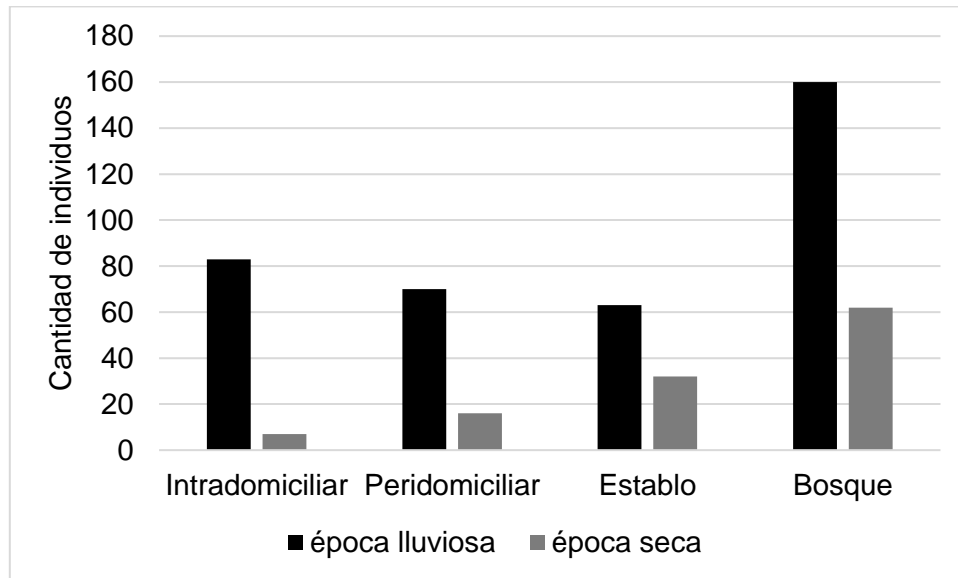


Figura 8: Comparación de la cantidad de individuos capturados en la zona de Cuajiniquil en las dos épocas de muestreo basado en la localización de las trampas.

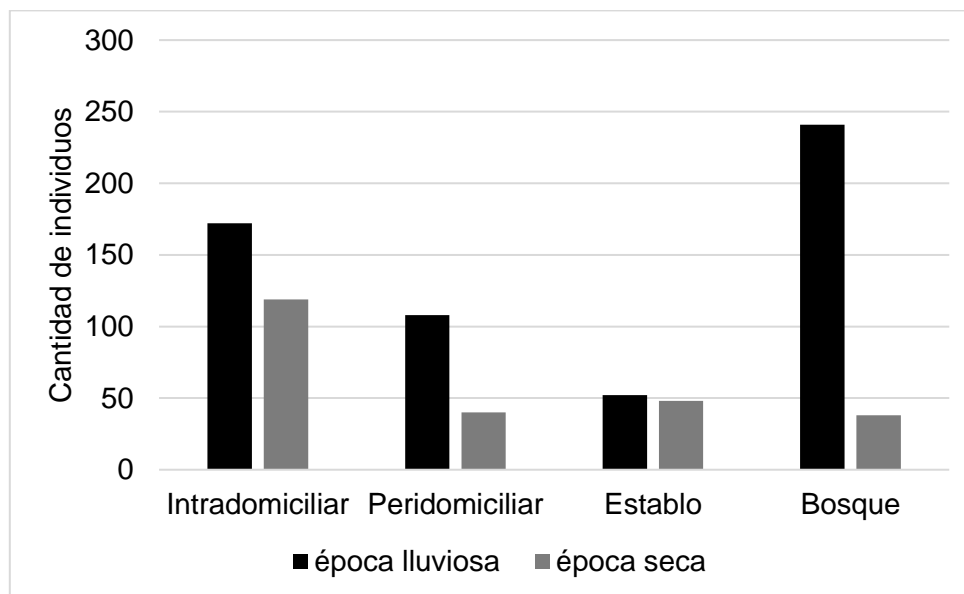


Figura 9: Comparación por cantidad de individuos capturados en la zona de Talamanca en las dos épocas de muestreo basado en la localización de las trampas.

Clasificación de mosquitos y aves

- En total se capturaron 139 aves silvestres, algunas especies son migratorias pero la gran mayoría son residentes.
- En el caso de los mosquitos se capturaron 1312 ejemplares en 128 noches trampa.
- La mayoría de los mosquitos colectados pertenecen a la especie *Cx. quinquefasciatus*, uno de los principales vectores de WNV en otras regiones.
- La trampa “bosque” es la que representa mayor éxito de captura para mosquitos, seguida de la trampa “intradomiciliar”.

6.3. Evidencia serológica de infección previa con WNV en equinos, aves y seres humanos.

6.3.1. Los equinos de la zona de Cuajiniquil presentan anticuerpos contra WNV.

Los sueros equinos fueron tomados en época lluviosa y época seca, preferiblemente a los mismos animales de manera que se pudieran evidenciar eventos de seroconversión. Estos fueron analizados inicialmente en una dilución 1/10 contra el virus de WNV por medio de PRNT y fueron clasificados como: neutralización total ($\geq 90\%$), neutralización parcial ($< 89\%$) y no neutralización, basado en el promedio de UFP del control viral (figura 10). En cada grupo de placas se incluyó un control de células el cual consiste en agregar solamente MEM con un 2% SFB, un control de virus por cuadruplicado (para obtener el 100% de placas) y un control de suero el cual es el suero de un animal previamente vacunado contra WNV (figura 11). Los sueros que neutralizaron totalmente fueron seleccionados para realizar una titulación de anticuerpos contra WNV y SLEV, debido a que son los agentes arbovirales más probables a encontrar en estos animales. El objetivo de realizar la titulación de anticuerpos es descartar la posibilidad de reacción cruzada entre estos dos virus.

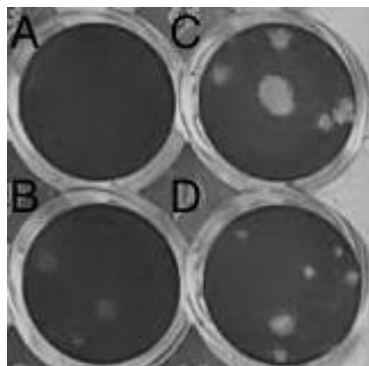


Figura 10: Placa donde se muestra los diferentes tipos de neutralización. A: suero con neutralización total, la monocapa se encuentra intacta. B: Suero con neutralización parcial (<89%), la monocapa presenta placas C-D: Suero clasificado como no neutralizó, la monocapa presenta placas en igual o mayor número que el control viral.

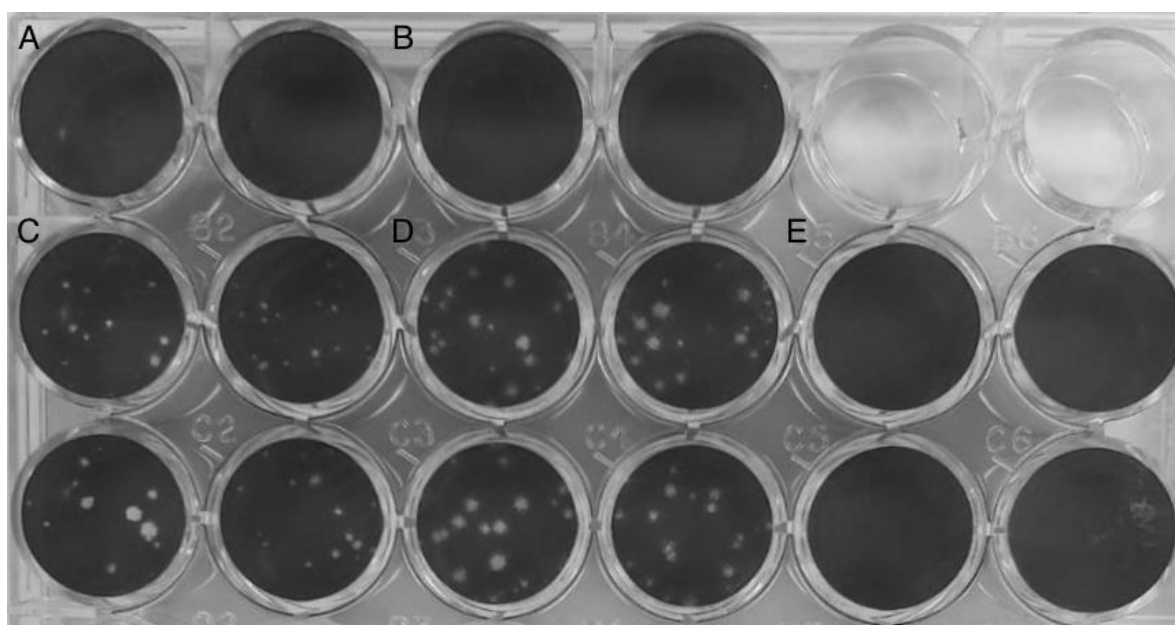


Figura 11: Placa donde se muestran los controles de sueros y los controles virales. El promedio de UFP para cada virus se utiliza como el 100%. A: suero control positivo para SLEV (neutraliza). B: Suero control positivo para WNV (neutraliza). C: Control viral para SLEV. D: control viral para WNV. E: control de células

En la zona de Cuajiniquíl se analizaron 143 sueros de equinos: 86 sueros fueron colectados en la época lluviosa y 57 en época seca. En la época lluviosa 69 sueros (80.2%) presentaron una neutralización total mientras que en la época seca 49 (86%). Tres animales que fueron

negativos en la época lluviosa tuvieron una neutralización total en la época seca, demostrando seroconversión.

En la zona de Talamanca se analizaron 36 sueros de equinos: 20 fueron colectados en la época lluviosa y 15 de la época seca. En esta zona luego de realizar la selección inicial 9 animales en la época lluviosa, así como, en la época seca (45%, 60% respectivamente) presentaron neutralización total.

Seguidamente, a los sueros que presentaron neutralización total se les realizó una titulación específica con PRNT $\geq 90\%$ contra los dos virus más probables. Esta prueba consiste en determinar el título de anticuerpos contra los Flavivirus más probables que circulen en la región de manera que se pueda decir inequívocamente a que virus están dirigidos estos anticuerpos. El suero se considera que tiene anticuerpos contra un determinado virus si presenta una neutralización con cuatro diluciones de diferencia respecto a otro virus (figura 12) (51). En caso de que no presente cuatro diluciones de diferencia, los animales se consideran positivos contra Flavivirus. En el caso de los equinos los Flavivirus más probables en Costa Rica son WNV y SLEV.

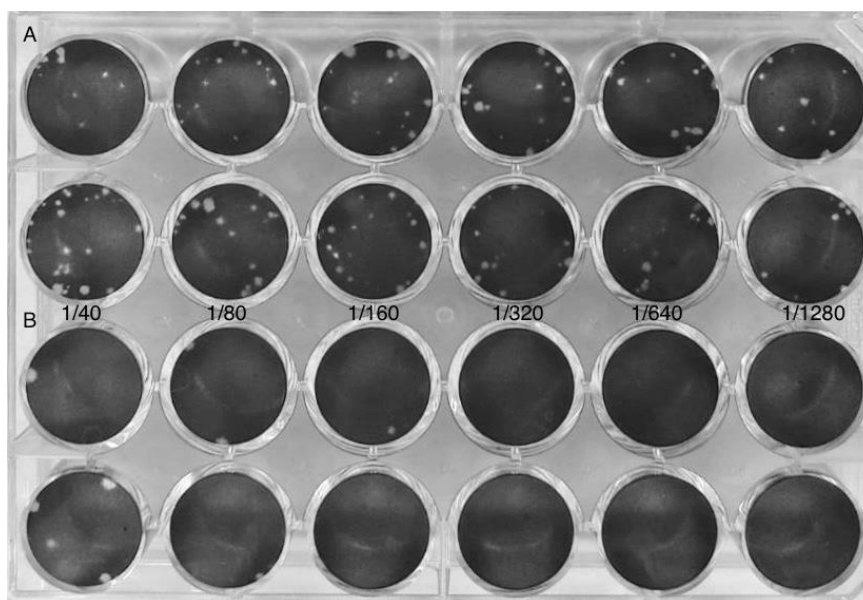


Figura 12: Placa donde se muestra la titulación del suero ESCL15. A: titulación contra el virus de SLEV, notese que el suero no posee anticuerpos. B: Titulación contra el virus de

WNV notese que neutraliza desde la dilución 1/40 por lo que se puede determinar que presenta anticuerpos contra WNV.

En la zona de Cuajiniquil 118 sueros equinos se seleccionaron para ser titulados por PRNT $\geq 90\%$. En la época lluviosa, 21 sueros (24.42%) tuvieron anticuerpos contra WNV, 6 (6.98%) para SLEV, mientras que 42 (48.83%) tuvieron títulos similares para ambos virus (no cumplían las cuatro diluciones de diferencia) por lo cual se clasificaron como positivos para anticuerpos contra Flavivirus (Flavivirus positivos) (cuadro 12). Para la época seca 13 (22.81%) sueros presentaron anticuerpos para WNV, 3 (5.26%) para SLEV y 33 (57.90%) fueron clasificados como Flavivirus positivos (cuadro 12). En esta zona 3 animales que fueron negativos en la época lluviosa fueron positivos en el segundo muestreo demostrando eventos de seroconversión. Uno de los sueros (ESCA5) presentó títulos para WNV de $>1:1280$ y $<1:40$ para SLEV, cumpliendo con el criterio de cuatro diluciones respecto al otro virus. Esto permite concluir que corresponde a un evento de seroconversión reciente. Para los otros dos sueros, se obtuvo un título indeterminado para Flavivirus por lo que deben ser analizados contra otros flavivirus (DENV o ZIKV).

Cuadro 12: Número total de sueros equinos analizados por zona y época de muestreo. Además, se muestra el número de animales positivos a la clasificación inicial y el número de positivos a la posterior titulación por medio de la técnica de PRNT $\geq 90\%$ contra el virus de SLEV y WNV

Localización	Época	N	Número de animales positivos a la clasificación inicial	Número de animales positivos luego de la titulación por medio de PRNT $\geq 90\%$		
				WNV	SLEV	Flavivirus positivos
Cuajiniquil	Lluviosa	86	69 (80.2%)	21 (24.42%)	6 (6.98%)	42 (48.83%)
	Seca	57	49 (86%)	13 (22.81%)	3 (5.26%)	33 (57.90%)
Talamanca	Lluviosa	20	9 (45%)	0 (0%)	1 (5%)	8 (40%)
	Seca	15	9 (60%)	0 (0%)	1 (6.67%)	8 (53.33%)

Para la zona de Talamanca, solo 1 (6.67%) de los sueros al que se le realizó titulación tuvo anticuerpos contra SLEV. Los 8 (53.33%) sueros restantes tuvieron títulos similares para ambos virus por lo que se clasificaron como Flavivirus positivos (cuadro 12). Costa Rica es un país endémico para otros Flavivirus como los son DENV y ZIKV. Debido a lo anterior y a una reciente publicación donde se describe que estos animales pueden presentar anticuerpos para estos dos virus (65), es importante evaluar posteriormente si este serocruzamiento se debe a la presencia de anticuerpos contra DENV o ZIKV.

6.3.2. Ensayos serológicos de PRNT evidencian de circulación de WNV y SLEV en seres humanos

La metodología para la clasificación de los sueros fue igual a la utilizada en los equinos (sección 6.3.1). Debido a la circulación de otros Flavivirus en Costa Rica asociados mayoritariamente a humanos, estos sueros fueron titulados contra 7 diferentes agentes, los resultados se muestran en el cuadro 13.

En la zona de Cuajiniquil se analizaron un total de 19 sueros en la época lluviosa y 19 en la época seca. En la época lluviosa, 2 sueros neutralizaron totalmente WNV por lo que posteriormente se le realizó la titulación por medio de la técnica de PRNT $\geq 90\%$ para determinar si los anticuerpos eran contra WNV o producto del serocruzamiento.

Luego de la titulación, un suero fue positivo a anticuerpos contra WNV con un título de $>1/640$. Otro suero tuvo un título indeterminado (no cumplía con las 4 diluciones de diferencia) por lo que se clasificó como flavivirus positivo (cuadro 13). En la época seca, 5 sueros neutralizaron totalmente contra WNV en el ensayo inicial. Igualmente, a estas muestras se les realizó la titulación. Este ensayo mostró que el mismo suero que resultó positivo para WNV en la época lluviosa fue positivo en la época seca con un título de $1/640$ (cuadro 13). Esto puede sugerir una infección reciente debido a que los títulos se mantuvieron altos. El suero que fue clasificado como Flavivirus positivo en el muestreo de la época lluviosa fue positivo a SLEV en este segundo muestreo, lo que evidencia una seroconversión y sugiere una circulación reciente de este virus en la región. Además, 3 sueros, los cuales fueron negativos en la época lluviosa se tornaron positivos a DENV-1 en este segundo muestreo. Esto sugiere que DENV-1 también circuló activamente en la región.

En el caso de Talamanca se analizaron 17 sueros en la época lluviosa y 15 en la época seca (cuadro 13). En la época lluviosa 3 sueros neutralizaron totalmente. Seguidamente, se les realizó la titulación. Dos sueros fueron positivos a SLEV y un suero tuvo el mismo título para DENV-1 y DENV-2 por lo que una posibilidad es que la persona haya estado en contacto con los dos virus. En la época seca se obtuvieron los mismos resultados. Una de las muestras positivas a SLEV en el primer muestreo no pudo ser evaluada en el segundo muestreo debido a que no se pudo obtener esta segunda muestra.

Cuadro 13: Número total de sueros de seres humanos analizados. Además, se muestra el total de sueros con neutralización total en la clasificación inicial y el número de sueros positivos a la posterior titulación por medio de la técnica de PRNT $\geq 90\%$ contra los virus de WNV, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, ZIKV, YF y SLEV

Localización	Época	N	Número de sueros positivos a la clasificación inicial	Número de personas positivos luego de la titulación por medio de PRNT $\geq 90\%$							
				WNV	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	ZIKV	YF	SLEV
Cuajiniquil	Lluviosa	19	2 (10.52%)	1 (5.26%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Seca	19	5 (26.31%)	1 (5.26%)	3 (15.78%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5.26%)
Talamanca	Lluviosa	17	3 (17.64%)	0 (0%)	1 (5.88%)*	1 (5.88%)*	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (11.76%)
	Seca	15	2 (13.33%)	0 (0%)	1 (6.66%)*	1 (6.66%)*	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6.66%)

*Estos resultados corresponden a la misma persona. Para ambos virus se presenta un título neutralizante igual por lo que no se puede distinguir entre ellos.

6.3.3. Las aves presentaron evidencia serológica por la metodología de PRNT $\geq 90\%$ de infección con WNV

En ambas zonas se analizaron 124 sueros de aves silvestres y 39 de gallinas domésticas. No se pudo evaluar la totalidad de las aves silvestres atrapadas porque, debido a su tamaño algunas muestras de suero fueron insuficientes. A los sueros se les realizó un ensayo inicial en una dilución de 1/10 contra el virus de WNV por medio de PRNT. Los sueros que presentaron neutralización total se les realizó una titulación por medio de la técnica de PRNT $\geq 90\%$ para descartar reacciones de serocruzamiento. En el caso de las aves, la titulación se llevó a cabo contra WNV y SLEV debido a que son los agentes más probables en aves en la región de Centro América. En el cuadro 14 y 15 se muestra la distribución de la cantidad de animales positivos a WNV, SLEV y Flavivirus positivos por zona y época de muestreo.

Cuadro 14: Número de muestras analizadas y resultado del ensayo PRNT $\geq 90\%$ en sueros de aves silvestres por zona y época en las dos localidades evaluadas.

Zona	época	N aves	Número de aves positivas a la clasificación inicial	WNV	SLEV	Flavivirus positivos
Cuajiniquil	Lluviosa	14	2 (14.28%)	0 (0%)	1 (7.14%)	1 (7.14%)
	Seca	35	2 (5.71%)	1 (2.86%)	0 (0%)	1 (2.86%)
Talamanca	Lluviosa	52	2 (3.87%)	0 (0%)	1 (1.92%)	1 (1.92%)
	Seca	27	2 (7.41%)	0 (0%)	1 (3.70%)	1 (1.92%)

Cuadro 15: Número de muestras analizadas y resultados del ensayo PRNT $\geq 90\%$ en sueros de gallinas domésticas por zona y época en las dos localidades evaluadas

Zona	Época	N	Número de gallinas positivas a la clasificación inicial	WNV	SLEV	Flavivirus positivos
Cuajiniquil	Lluviosa	29	3 (10.34%)	1 (3.45%)	1 (3.45%)	1 (3.45%)
	Seca	3	2 (66.67%)	1 (33.33%)	0 (0%)	1 (33.33%)
Talamanca	Lluviosa	7	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Seca	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

En la zona de Cuajiniquil un total de 43 sueros de aves silvestres y 32 sueros de gallinas domésticas se les realizó el ensayo inicial contra WNV en una dilución 1/10 (cuadro 14 y 15). Cuatro sueros de aves silvestres y 2 de gallinas neutralizaron totalmente. Luego de realizar el ensayo PRNT $\geq 90\%$, dos sueros: uno de un ave silvestre y uno de gallina presentaron anticuerpos específicos contra WNV. Además, un suero de un ave silvestre presentó anticuerpos neutralizantes contra SLEV. En los otros tres casos los títulos de ambos virus son similares por lo que no se puede discriminar entre positividad contra ninguno de los dos virus.

El ave positiva para WNV es una hembra de *Campylorhynchus rufinucha*, la cual fue capturada en la red peridomiliar de la casa CSCM. Esta especie es no migratoria, común del Norte de la vertiente del Pacífico hasta el Parque Nacional Carara con una distribución que va desde el nivel del mar hasta los 800 msnm (Inbio, <http://www.crbio.cr:8080/neoportal-web/species/Myiozetetes%20similis>, revisado el 27 de junio, 2019). En el caso de la gallina, corresponde a un animal de la casa CSCB. En esta zona es muy común que se mantengan gallinas de traspatio. Este tipo de animales está ampliamente descrito que funcionan como centinelas para WNV debido a que presentan seroconversión, pero no desarrollan la enfermedad (53, 74).

El ave que presentó anticuerpos neutralizantes para SLEV fue un *Turdus grayi* macho el cual fue atrapado en la red bosque de la casa CSCD. Esta especie se encuentra distribuida en todo el país, desde las bajuras hasta 2450 msnm, y se puede encontrar tanto en áreas urbanas, suburbanas, cafetales, bosques entre otros (Inbio, <http://>

[//www.crbio.cr:8080/neoportal-web/species/Empidonax%20virescens](http://www.crbio.cr:8080/neoportal-web/species/Empidonax%20virescens), revisado el 27 de junio de 2019).

En la zona de Talamanca se evaluaron 81 sueros de aves silvestres y 7 sueros de gallinas domésticas (cuadro 14 y 15). A estos sueros se le realizó el ensayo inicial contra WNV en una dilución 1/10. Dos aves silvestres neutralizaron totalmente, sin embargo, ninguno de los sueros de gallina presentó neutralización total. Seguidamente, a los sueros de aves silvestres con neutralización total se les realizó la titulación por medio del ensayo de PRNT $\geq 90\%$. Dos aves presentaron anticuerpos específicos contra SLEV, las otras obtuvieron títulos similares por lo que no se pudo discriminar positividad contra ninguno de estos dos virus.

Una de las aves positiva fue un macho de *Empidonax virescens*, el mismo fue capturado en la red peridomiliar de la casa CTAJ. Esta es una especie migratoria común en las partes bajas del Caribe entre setiembre y noviembre. Esta especie migra desde el Sur de Canadá a pasar el invierno en la zona comprendida entre el este de Nicaragua hasta el sur de Panamá (Inbio, <http://www.crbio.cr:8080/neoportal-web/species/Empidonax%20virescens>, revisado el 27 de junio, 2019). Al ser un ave migratoria no se puede determinar si el contacto con el virus lo tuvo en Costa Rica o en alguno de los países que tiene en su ruta de migración.

En el caso de la otra ave la cual corresponde a un macho de *Myiozetetes similis*, el cual fue atrapada en la unidad habitacional CTAH en la red bosque. Esta ave es un residente común a lo largo del país, desde las bajuras hasta 1700 msnm, y se desplaza a partes más altas en las épocas de reproducción. Se puede encontrar en los bordes de los bosques, pastizales, claros con bosques dispersos, cafetales y manglares, así como, en áreas urbanas y suburbanas (Inbio, <http://www.crbio.cr:8080/neoportal-web/species/Myiozetetes%20similis>, revisado el 28 de junio de 2019). Por lo cual se puede concluir que el contacto con el virus de SLEV se presentó a nivel local.

Los ensayos serológicos evidencian la circulación de WNV

- En la zona de Cuajiniquil se encontró evidencia serológica de contacto con el virus de WNV en humanos, equinos, gallinas domésticas y aves silvestres
- En la zona de Talamanca no se encontró evidencia serológica de contacto con WNV, sin embargo, se pudo evidenciar que tanto las personas, aves silvestres y equinos han estado expuestos a SLEV.
- Una de las aves que presentó anticuerpos contra WNV es residente por lo que sugiere un contacto local con el virus.

6.4. No se evidenció infección activa por WNV en aves y mosquitos por medio de detección del ARN viral en las muestras

En ambas zonas de estudio se capturó y analizó un total de 140 aves silvestres y 362 pools de mosquitos mediante RT-PCR para Flavivirus con un RT-PCR de género (68). Tres muestras de aves y 5 pools de mosquitos fueron positivos para el género flavivirus. A las muestras se les realizó secuenciación tipo Sanger y los resultados fueron comparados con las bases de datos públicas. En el caso de los mosquitos, seis pools fueron similares a ZIKV (97.25%-98.9 de similitud) (cuadro 16).

En el caso de los pájaros, al realizar la comparación con la base de datos, arrojó que la secuencia es similar a un "ave", lo que indica que los cebadores se unieron inespecíficamente al ADN del ave silvestre. Para descartar completamente que fuera WNV, a la muestra del pool de órganos y a cada órgano por separado de esta misma ave se les realizó el RT-PCR específico para WNV. Todos los resultados fueron negativos.

Por medio de RT-PCR no se evidenció infección activa por WNV

- No se encontró evidencia molecular en los órganos de aves y los pools de mosquitos de una infección activa por WNV
- Seis pools de mosquitos fueron positivos a ZIKV

Cuadro 16: Especies de mosquitos positivas a Flavivirus, localización y número de acceso de la secuencia con la cual tienen una mayor identidad

Especie	Virus reportado con identidad positiva post comparación de secuencias. Entre paréntesis se muestra el porcentaje de similitud	Localización	Número de acceso de la secuencia con mayor identidad
<i>Culex restrictor</i>	ZIKV (98.9%)	CSCA	MG807647.1
<i>Culex restrictor</i>	ZIKV (97.76%)	CSCA	MG807647.1
<i>Culex</i> (<i>Culex</i>) <i>quinquefasciatus</i>	ZIKV (97.25%)	CSCA	MH179341.1
<i>Psorophora confinnis</i>	ZIKV (97.61%)	CSCB	MG976700.1
<i>Deinocerites</i> <i>epitedeus</i>	ZIKV (97.81%)	CSCC	MG807647.1
<i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>) sp	ZIKV (98.5%)	CTAC	MG976700.1

6.5. La determinación de los patrones de alimentación en mosquitos evidenció la gran variedad de fuentes de sangre

A un total de 32 hembras grávidas se les analizó su preferencia de alimentación mediante amplificación y secuenciación tipo Sanger de parte del citocromo oxidasa subunidad 1 (COI 1). En 23 especies se logró determinar con claridad el patrón de alimentación (cuadro 17).

Las especies del género *Culex* son las que se han asociado como vectores competentes para WNV (33, 37). La clasificación de los mosquitos determinó que el 82.6% de las hembras grávidas correspondió a este género, siendo *Cx. quinquefasciatus* (n=11, 47.82%) la especie más representada. Los mosquitos presentaron un patrón de alimentación mayoritariamente de perros (*Canis lupus familiaris*) (n=6, 31.57%), seguido de humanos (*Homo sapiens*) (n=5, 26.31), caballos (*Equus caballus*), (n=4, 21.05%), ovejas (*Ovis aries*) (n=4, 21.05%) y un ave (*Columbina passerina*) (n=1, 5.2%). Además, se logró identificar un patrón mixto de alimentación (perro/humano). Esto confirma la diversidad de alimentación de este género. Esta diversidad constituye la principal razón por la cual son excelentes vectores de enfermedades infecciosas como SLEV y WNV. Cuando el animal se alimenta de un reservorio (por ejemplo un ave infectada en el caso de WNV y SLEV) y posteriormente de un hospedero accidental (por ejemplo humanos y equinos) se presenta esta transmisión (33).

Cuadro 17: Identificación, especie y diversidad de patrones de alimentación de las hembras grávidas colectadas en Cuajiniquil (inician con O) y Talamanca (inician con T).

Identificación	Especies	Patrón de alimentación
OEC7	<i>Culex restrictor</i>	Caballo (<i>Equus caballus</i>)
OFC22	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Caballo (<i>Equus caballus</i>)
OFC4	<i>Anopheles albimanus</i>	Humano (<i>Homo sapiens</i>)
OMC4	<i>Deinocerites pseudus</i>	Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)
TBC1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)
TCC1	<i>Culex coronator</i>	Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)
TCC2	<i>Culex coronator</i>	Humano (<i>Homo sapiens</i>)
TCC23	<i>Culex (Melanoconion) sp</i>	Caballo (<i>Equus caballus</i>)
TCC24	<i>Culex coronator</i>	Caballo (<i>Equus caballus</i>)

TDC8	<i>Psorophora ferox</i>	Humano (<i>Homo sapiens</i>)
TFC1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Oveja (<i>Ovis aries</i>)
TFC2	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Humano (<i>Homo sapiens</i>)
TFC3	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Humano (<i>Homo sapiens</i>)
TFC4	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Oveja (<i>Ovis aries</i>)
TFC5	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Oveja (<i>Ovis aries</i>)
TFC26	<i>Culex (Melanoconion) sp</i>	Oveja (<i>Ovis aries</i>)
TGC3	<i>Culex pseudostigmatosoma</i>	Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)
TGC4	<i>Culex pseudostigmatosoma</i>	Humano (<i>Homo sapiens</i>)
THC3	<i>Culex quinquefasciatus</i>	<i>Columbina passerina</i>
TMC7	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)
TMC8	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)/ Humano (<i>Homo sapiens</i>)
TMC9	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)
TNC9	<i>Mansonia titillans</i>	Caballo (<i>Equus caballus</i>)

Diversidad de patrones de alimentación de las hembras grávidas:

- Los mosquitos del género *Culex* presentaron patrones de alimentación muy variados (perros, humanos, caballos, ovejas y aves).
- *Cx. quinquefasciatus* fue la especie más representada y con mayor variabilidad en el patrón de alimentación.

6.6. El análisis estadístico muestra una correlación entre la edad y la positividad a Flavivirus

Los resultados que se utilizaron fueron los sueros positivos de los equinos correspondientes a la zona de Cuajiniquil porque la zona de Talamanca no presentó evidencia de circulación de WNV. Para este análisis se utilizaron los sueros de la época lluviosa debido a que los sueros del muestreo de la época seca correspondían a una segunda muestra de estos y los resultados entre ambos muestreos fueron similares.

Debido a la naturaleza de la información se utilizó una prueba de Chi-cuadrado para analizar la relación entre el sexo del animal y la seropositividad de los equinos. Los resultados muestran que no existe una correlación entre el sexo y la seropositividad contra WNV ($p=0.336$).

Como la distribución de los datos no es normal, se realizó una prueba de coeficiente de correlación de Spearman (R_s) entre la edad y la seropositividad contra WNV, así como, la edad y los sueros clasificados como Flavivirus positivos. El coeficiente de correlación entre la edad y la seropositividad contra WNV fue de $R_s = -0.5601$, ($p=0.005$ y $p<0.001$) (figura 13). Esto sugiere que los animales se infectan con el virus a tempranas edades. Una de las posibles razones de una infección a temprana edad es la circulación activa del virus en el área (42, 46). Esto puede llevar a que los animales se expongan a tempranas edades.

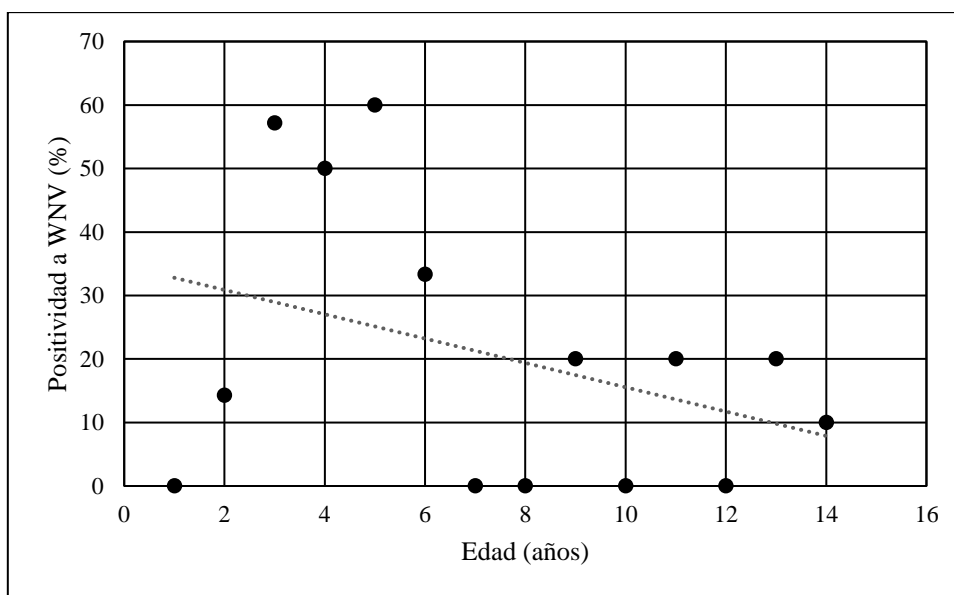


Figura 13: Correlación entre la edad y la seropositividad a WNV en equinos de la zona de Cuajiniquíl. El coeficiente de correlación ($R_s = -0.5601$) muestra una correlación negativa entre la edad y la seropositividad contra WNV en las pruebas de neutralización por PRNT $\geq 90\%$.

En el caso de los animales que fueron positivos a Flavivirus el coeficiente de correlación fue: $R_s = 0.5122$ ($p=0.005$ y $p<0.001$). Lo que muestra una correlación positiva entre la edad y ser positivos a Flavivirus (presentan anticuerpos antflavivirus, pero no cumplen con el

criterio de cuatro diluciones de diferencia entre los virus analizados (SLEV, WNV)). Esta correlación junto con la correlación edad-WNV positivos, sugiere que los animales se infectan a edades tempranas y posteriormente tienen contacto con otros Flavivirus por ejemplo SLEV. Además, más recientemente se ha descrito en la literatura que los equinos pueden presentar anticuerpos contra DENV y ZIKV (65), los cuales también circulan en la región. Este conjunto de factores lleva a que los animales de mayor edad presenten respuestas Flavivirus positivas que no se logre determinar con precisión con cual o cuales agentes ha tenido contacto en el pasado (Figura 14).

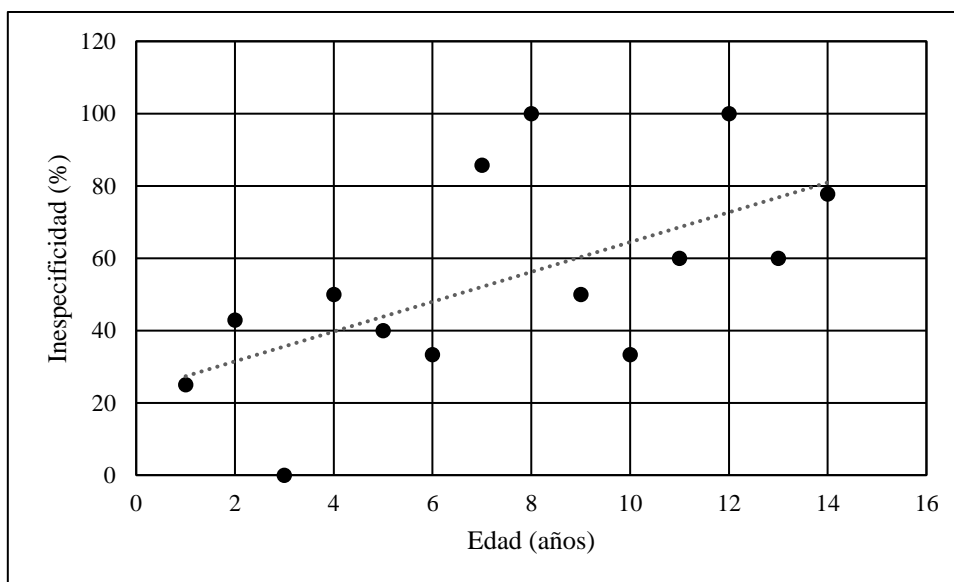


Figura 14: Correlación entre la edad y los equinos clasificados como Flavivirus positivos en la zona de Cuajiniquil. El coeficiente de correlación ($R_s = 0.5122$) muestra una asociación positiva entre la edad y los sueros flavivirus positivos en las pruebas de neutralización por PRNT $\geq 90\%$.

Análisis estadístico

- Los animales más jóvenes presentan títulos específicos para WNV.
- Los animales de mayor edad poseen anticuerpos contra Flavivirus, pero no se puede distinguir contra cual o cuales, muy probablemente porque han estado en contacto con varios Flavivirus.

7. Discusión

El Virus del Oeste del Nilo (WNV) es una importante zoonosis la cual se ha dispersado por todo el continente americano desde su introducción en 1999 (75). En Costa Rica, desde el año 2004, se encontró evidencia serológica en equinos de contacto con el virus (42). Además, anualmente se presentan casos clínicos en equinos asociados a la enfermedad (46). La mayoría de estos casos se han ubicado en las zonas bajas de la provincia de Guanacaste (cuadro 1). La presencia de este virus podría representar un importante problema de salud pública humana debido a que presenta signos clínicos similares a otros Flavivirus que circulan (DENV y ZIKV) en el país.

El país posee una gran variedad de especies de aves y mosquitos (24, 58), además la región Caribe Sur es uno de los pasos de aves migratorias más importantes a nivel mundial (The Cornell Lab of Ornithology, <https://www.allaboutbirds.org/mesmerizing-migration-watch-118-bird-species-migrate-across-a-map-of-the-western-hemisphere/>, revisado 05 de agosto de 2019). Esta diversidad representa un gran número de potenciales reservorios y vectores para el virus de WNV en Costa Rica, los cuales actualmente son desconocidos.

7.1. En la zona de Cuajiniquil existe evidencia serológica de circulación de WNV.

Los resultados de los análisis serológicos por medio de PRNT $\geq 90\%$ evidencian contacto previo con el virus tanto en humanos (5.2%), equinos (24.42%) y aves (2.04% en aves silvestres y 3.13% de gallinas domésticas). Esto sugiere que tanto el ciclo mosquito-ave como mosquito- humano o equino se está presentado en la región. La seroprevalencia en aves silvestres es cercana a la reportada por un estudio en Jamaica, Puerto Rico y México, el cual determina que 0.06-1.1% de las aves poseían anticuerpos contra WNV (18). En el caso de los equinos coincide con lo reportado por Hobson-Peters et al. 2011 en cual establece una seroprevalencia para la zona del noroeste de Guanacaste entre 18% a 28% (42).

El ave positiva a anticuerpos contra WNV corresponde *Campylorhynchus rufinucha*, esta especie pertenece al género *Paseriforme*, los cuales se consideran los reservorios primarios del virus (76). Esta especie es un ave residente por lo que se puede deducir que el contacto con WNV se dio a nivel local. Esta misma evidencia se encontró en una gallina

doméstica de traspatio, de la misma región mas no de la misma unidad habitacional. Las gallinas se han utilizado como centinelas para analizar la circulación viral en otras regiones (53).

Los equinos al igual que los seres humanos pueden desarrollar el cuadro asociado a la enfermedad (14). En ambos casos se demostró evidencia serológica de contacto previo con el virus. Varios de los caballos presentaron altos niveles de anticuerpos contra WNV, lo que sugiere un contacto reciente, además uno de los caballos que fue negativo en el primer muestreo fue positivo con un título alto ($>1/1280$) en la segunda muestra, evidenciando un evento de seroconversión y, por lo tanto, se puede sugerir una circulación reciente del virus en esta área.

Una gran parte de los equinos presentaron anticuerpos contra Flavivirus, pero no se puede diferenciar contra cuál de los dos virus evaluados (WNV y SLEV) iban dirigidos esos anticuerpos (no cumplían con el criterio de 4 diluciones de diferencia), o si corresponden a otros Flavivirus circulantes en el país (DENV o ZIKV). Para analizar si, existe relación entre la edad y el hecho de ser “Flavivirus positivos” se realizó una correlación de Spearman entre la edad y los animales que presentaron anticuerpos específicos para WNV, y entre la edad y los animales que fueron clasificados como “Flavivirus positivos”. Mediante este análisis estadístico se evidenció que entre más jóvenes los animales, estos presentaban anticuerpos específicos contra WNV, por el contrario, a mayor edad mayor número de animales clasificados como “flavivirus positivos”. Una de las posibles razones de esta relación puede estar ligada a una temprana exposición a WNV y en el transcurso de la vida se ven expuestos a otros Flavivirus (17). Además, un estudio reciente ha demostrado que otros agentes como DENV y más recientemente ZIKV pueden generar anticuerpos en equinos, dando aún más reacciones inespecíficas en estos animales por serocruzamiento (65). Estos dos últimos agentes no fueron evaluados en este estudio, pero deben evaluarse en un estudio posterior.

La técnica de PRNT $\geq 90\%$ es el estándar de oro que permite identificar inequívocamente anticuerpos contra WNV (77). Esta técnica solo se había utilizado en Costa Rica en la investigación de Hobson-Peters *et al.* 2004 en equinos (42). Sin embargo, no se había empleado en sueros de aves silvestres, gallinas y seres humanos. Este estudio demuestra la importancia de realizar esta técnica como confirmación para animales y seres humanos

que son positivos por ELISA de IgG (77), ya que como se observó en este estudio muchos de los sueros que son positivos a la dilución 1/10 son producto del serocruzamiento entre los diferentes Flavivirus.

7.2. Por medio de RT-PCR no se pudo demostrar ninguna infección activa por WNV en aves y mosquitos

Este estudio no pudo demostrar molecularmente la presencia del virus en aves silvestres y mosquitos en las dos zonas de análisis. En investigaciones similares en México se logró identificar el virus de WNV por medio de RT-PCR en aves silvestres en rangos desde 8-13.5% (26, 78). En estos estudios, la mayoría de las aves positivas eran migratorias y se presume que se infectaron en Estados Unidos e iniciaron su migración hacia el Sur en fase de viremia (26, 78). En aves, se ha determinado que esta fase dura alrededor de 10 días (32). Este factor puede explicar el hecho que los animales se infecten en Estados Unidos, inicien su migración y en 10 días o menos puedan estar en México. Esto aumentaría el porcentaje de animales positivos que se encuentran en esas regiones. Por medio de la serología, se demostró la circulación activa del virus en la región de Cuajiniquil, sin embargo, se deben realizar muestreos más exhaustivos para tratar de obtener resultados positivos por RT-PCR.

Las seroconversiones, la positividad por medio de serología en: seres humanos, equinos, un ave silvestre residente y una gallina doméstica, permite concluir que esta zona hubo circulación activa del virus (17). La evidencia serológica da información de contacto previo con el virus, sin embargo, no permite establecer cuándo exactamente ocurrió esa infección. Mediante el análisis de seroconversiones se puede deducir que la circulación es reciente. En contraste, la evidencia molecular aporta información sobre una infección activa con el virus. El hecho de obtener un ave o un mosquito positivo por RT-PCR hubiera sido ventajoso para poder identificar la cepa viral circulante, debido a que esta información no puede ser analizada por medio de ensayos serológicos (26).

7.3. La mayoría de los mosquitos recolectados pertenecían al género *Culex*

Al realizar la clasificación de los mosquitos se determinó que la mayoría de las especies recolectadas en la zona de Cuajiniquil especialmente en la época lluviosa pertenecen al género *Culex*. Varias especies dentro de este género se han asociado con ser vectores de

WNV, entre ellas *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus* las cuales fueron identificadas en esta área (29, 33, 37). En el análisis de los patrones de alimentación *Cx. quinquefasciatus* (47.82%) fue la especie más representada y se determinó que se alimenta de perros, humanos, caballos, ovejas y ave silvestre. Este patrón de tener varias fuentes de alimentación constituye la principal razón por la cual son excelentes puentes vectoriales de enfermedades infecciosas como WNV (29, 37). Esto se debe a que el mosquito puede alimentarse de un ave virémica y en una posterior alimentación transmitir el virus a un hospedero mamífero accidental e iniciar un ciclo epizóotico (33). Otro factor importante, es el hecho que el mayor éxito de captura de mosquitos se obtuvo en la trampa “bosque”, seguida de la trampa “intradomiciliar”. Este dato es relevante debido a que pone en evidencia que no existe conciencia en la población sobre el uso de medidas para mitigar la posibilidad de picadura de los mosquitos dentro de sus hogares (por ejemplo cedazo en las ventanas).

7.4. En la zona de Talamanca se encontró evidencia de circulación de SLEV

Los resultados obtenidos de los análisis en la zona de Talamanca difieren con los obtenidos en Cuajiniquil. En Talamanca no se logró encontrar evidencia ni serológica ni molecular en las muestras recolectadas de contacto con WNV. Sin embargo, si se encontró evidencia serológica de la circulación de otro virus: SLEV. En esta zona se analizaron sueros de equinos y seres humanos, algunos de ellos con muestras pareadas, además sueros de aves silvestres y de gallinas domésticas. Molecularmente se procesaron aves silvestres y mosquitos agrupados en pooles y algunas hembras grávidas. Tanto en seres humanos (11.76%), equinos (5%) como aves silvestres (2.5%) se encontró evidencia serológica de contacto con SLEV. Lo que sugiere que tanto el ciclo ave-mosquito como mosquito- humano o equino se esta presentado en la región.

El virus de SLEV es uno de los arbovirus responsables de causar enfermedad febril en humanos (79). Los casos más severos presentan fiebre, disfunción neurológica, alteración de conciencia, encefalitis o meningoencefalitis (80, 81). Este virus es considerado endémico en toda América con casos reportados desde Canadá hasta Argentina (80–83). El ciclo de transmisión es similar al de WNV, donde los mosquitos del género *Culex*, los cuales fueron identificados ampliamente en esta zona de Talamanca, y aves del orden *Paseriformes* y *Columbiformes* funcionan como amplificadores (76). Los seres humanos y otros mamíferos

son hospederos accidentales (76). A los equinos se les ha propuesto como centinelas porque generan anticuerpos, pero no presentan signos clínicos (17). Sin embargo, en un reporte de Minas Gerais en Brasil, se caracterizó un aislamiento obtenido de un caballo con enfermedad neurológica, por lo tanto, debe ser considerado como un agente diferencial de otros virus que causen encefalitis equinas (84).

Los casos de encefalitis por SLEV se han presentado mayormente en Norte América, en contraste a la región de Sur América, donde solo se ha reportado un brote asociado con enfermedad neurológica en Córdoba, Argentina en el año 2005 (85). Otros casos reportados de SLEV se han identificado en brotes por el virus de DENV, cuando un paciente presentó síntomas compatibles con DENV sin embargo, en un estudio posterior se determinó que la causa de la enfermedad era SLEV, incluso se han reportado coinfecciones (80). Esto evidencia la importancia de realizar el diagnóstico diferencial con este agente. En Estados Unidos entre el año 2009 y 2018 se han reportaron 92 casos asociados a SLEV en humanos de los cuales 24 presentaron síntomas varios y 68 presentaron enfermedad neuroinvasiva con 6 muertes asociadas (CDC, <https://www.cdc.gov/sle/technical/epi.html>, revisado el 01 de agosto, 2019). La enfermedad se asocia a adultos mayores (mayores de 60 años) y personas inmunocomprometidas, en esta población, la tasa de mortalidad puede llegar a un 20% (80).

7.5. Existe evidencia circulación activa de varios Flavivirus en la zona de Cuajiniquil.

Los hallazgos de este estudio evidencian que tantos seres humanos, aves y equinos presentaron anticuerpos específicos contra WNV en la zona de Cuajiniquil. Además, se pudo documentar un evento de seroconversión en un equino. Asimismo, se evidenció la necesidad de confirmar por medio de PRNT $\geq 90\%$ los sueros sospechosos por otras técnicas, especialmente para estudios de seroprevalencia. Como se pudo observar, muchos sueros que fueron positivos en la dilución 1/10 posteriormente no presentaron anticuerpos contra WNV sino, contra SLEV, DENV o no se podía establecer el agente con el cual tuvieron contacto. Además, por medio de RT-PCR de los pools de mosquitos se evidenció la circulación de ZIKV. Es decir en esta área en el tiempo de estudio se puede sugerir que circularon WNV y DENV-1 (eventos de seroconversión) así como ZIKV (RT-

PCR positiva). Esta información confirma la importancia de realizar diagnósticos diferenciales para establecer el agente causal de enfermedad febril asociada a Flavivirus.

Para tratar de encontrar evidencia molecular se deben seguir realizando muestreos, especialmente en áreas que reporten casos clínicos positivos a WNV. Esta estrategia podría aumentar el éxito de obtener un ave positiva por RT-PCR y poder caracterizar molecularmente la cepa viral que presuntivamente podría circular en el país.

Otro hallazgo importante fue el demostrar la circulación de SLEV en Costa Rica por medio de serología. Tanto en aves, seres humanos y equinos se pudo encontrar anticuerpos contra este virus. Este agente ha sido poco estudiado en el país y como muestran investigaciones previas tanto en Estados Unidos como en Sur América puede llegar a causar síntomas similares a DENV o evolucionar hasta encefalitis en los casos más graves (82, 85, 86). Por lo cual, es importante que sea considerado un diagnóstico diferencial en personas que presenten sintomatología a DENV especialmente adultos mayores, así como, en personas con sospecha de encefalitis virales.

Las infecciones agudas en humanos pueden ser diagnosticadas por medio de RT-PCR. En fluidos (orina, plasma, líquido cefalorraquídeo o suero) esta técnica es más específica. Sin embargo, muchas veces son de poco valor para el diagnóstico debido a las bajas y cortas viremias previas a la aparición de síntomas (51). Debido a esto la detección de anticuerpos específicos continúa siendo la técnica más utilizada, especialmente el ELISA (77) aunque presente serocruzamiento con otros flavivirus.

El fenómeno de serocruzamiento entre los diferentes Flavivirus presenta un reto diagnóstico (77), especialmente en un país como Costa Rica donde existe una co-circulación de varios virus de esta familia (46, 57). El diagnóstico en equinos está basado actualmente en pruebas serológicas donde la prueba más utilizada y única son los ELISAS (51) los cuales podrían ocasionar falsos positivos y pueden enmascarar al verdadero agente causal (77). Es por este motivo que la prueba de PRNT $\geq 90\%$ sigue siendo considerada el estándar de oro para este tipo de diagnósticos (77). Sin embargo, estas pruebas son costosas y laboriosas por lo que se debe seguir trabajando en herramientas diagnósticas que nos provean información acertada en un tiempo más corto.

7.6. Se requiere educar a la población en medidas de prevención para evitar la picadura de mosquitos.

Otro aspecto relevante fue que tanto en Talamanca como en Cuajiniquil la trampa “intradomiciliar” fue la segunda con mayor éxito de captura, lo cual evidencia las pocas o nulas medidas de la población para mitigar la posibilidad de picaduras de mosquitos dentro de sus casas. Este dato se debe abordar desde campañas de educación por parte del Ministerio de Salud para que las personas internalicen la importancia del uso de mosquiteros, repelente, manga larga, cedazos y otras medidas que disminuyan la posibilidad de picaduras. Estas medidas evitarían no solo el contagio de WNV sino también ZIKV, DENV, SLEV así como los virus de Encefalitis Equina del Este y Venezolana (87).

7.7. Se requiere de la integración de los sectores de salud humana y animal para trabajar en conjunto la prevención y vigilancia de estos virus.

La información sobre seroepidemiología de WNV en humanos en Costa Rica es limitada. Las autoridades siguen considerando la enfermedad como “exótica” por lo tanto no existen planes de prevención. El abordaje preventivo y de vigilancia tanto de WNV como SLEV debe verse y manejarse desde un abordaje integral en el cual se involucre los sectores de salud humana y animal, los cuales deben trabajar de la mano desde el concepto de “Una Salud”, el cual se define como: “un esfuerzo colaborativo, multidisciplinario y transdisciplinario para lograr una salud óptima, reconociendo las interconexiones entre las personas, animales, plantas y el ambiente que comparte” (One Health Commission, https://www.onehealthcommission.org/en/why_one_health/what_is_one_health/, revisado 29 de julio, 2019).

Los caballos y las gallinas son excelentes centinelas para monitorear la circulación de WNV y SLEV (17). Está descrito que generalmente los equinos son los primeros en presentar sintomatología al inicio de algún brote (17), por lo que una excelente comunicación entre el sector veterinario y los encargados de salud humana puede alertar tempranamente sobre casos. De esta manera se pueden tomar medidas con el fin de mitigar los casos en humanos mediante campañas educativas sobre cómo prevenir la picadura del mosquito. Es necesario también implementar programas de control para monitorear los virus de WNV y SLEV. En este momento en Costa Rica no existe un plan de vigilancia activa de estas dos

virosis, por el contrario, lo que se realiza es una respuesta hacia un brote asociado a enfermedad sospechosa.

En países como Georgia, Túnez y Serbia en los cuales anualmente se presentan casos de WNV se instauró un modelo llamado: "Integración de la vigilancia de arbovirosis". Este modelo consiste en una asertiva comunicación entre los sectores involucrados en la vigilancia de arbovirosis (salud humana, salud animal, entomólogos, epidemiólogos entre otros) (88). El flujo de información inicia con el reporte de un caso sospechoso (humano o equino). El caso se notifica al encargado del programa el cual inicia el flujo de trabajo entre los diferentes sectores involucrados, de manera que cada uno asuma un rol asignado previamente (monitoreo y toma de muestras en humanos o equinos sospechosos, muestreo de mosquitos en la zona afectada, comunicación a la población entre otros) Este modelo también crea procedimientos estándar de como coleccionar, analizar y difundir la información entre las organizaciones involucradas en la vigilancia de las arbovirosis. Finalmente, la información es analizada de forma integral y se obtiene información como: factores de riesgo, mapeo de vectores, geolocalización de casos. Esto permite monitorear cuál es el movimiento del virus en los países y las zonas más propensas a la aparición de nuevos brotes (88).

Los hallazgos de este trabajo evidencian la circulación de WNV en el área de Cuajiniquil y de SLEV en el área de Talamanca. Este es el primer estudio exhaustivo que reporta de manera concluyente e inequívoca la presencia de anticuerpos neutralizantes contra SLEV y WNV en seres humanos, equinos y aves en Costa Rica. Estas dos arbovirosis deben ser tomadas en cuenta como diagnósticos diferenciales en seres humanos y equinos con enfermedad febril o neurológica. Esta investigación también confirma que la prueba de PRNT ≥ 90 % debe ser realizada en casos sospechosos WNV que se hayan diagnosticado por otras técnicas, debido a los fenómenos de serocruzamiento. Otro factor importante que promovió este trabajo fue la integración de microbiólogos y veterinarios, lo que permitió realizar abordajes integrales desde el concepto de "Una Salud". Se debe seguir realizando más trabajo e investigación conjunta con otros profesionales de la salud de manera que se logre implementar modelos de vigilancia para realizar abordajes integrales de esta y otras arbovirosis. Esta información reafirma la importancia de una asertiva comunicación entre los sectores veterinarios y de salud humana de manera que permita tomar acciones provisionarias y de control ante posibles brotes de estos dos (o más) virus.

8. Conclusiones

- 8.1. El virus de WNV circuló activamente en la zona de Cuajiniquil entre agosto 2017 y abril 2018 (período de estudio), esto se pudo evidenciar mediante la seroconversión de un equino.
- 8.2. Existe evidencia serológica de contacto con WNV en equinos, seres humanos, aves silvestres y domésticas en el área de Cuajiniquil.
- 8.3. En el área de Cuajiniquil se encontró evidencia serológica de circulación de DENV-1 y molecularmente de ZIKV en el período de estudio.
- 8.4. El virus de SLEV circula activamente en el área de Talamanca tanto en aves silvestres, seres humanos y equinos.
- 8.5. Los virus de SLEV y WNV deben ser considerados como diagnósticos diferenciales en casos clínicos sospechosos de arbovirosis tanto en seres humanos como en equinos
- 8.6. La prueba de PRNT \geq 90% debe ser utilizada como herramienta confirmatoria en casos positivos por ELISA y negativos por técnicas moleculares.
- 8.7. Las personas deben ser educadas en cómo prevenir las picaduras de mosquitos y así evitar el contagio de estas y otras arbovirosis.

9. Recomendaciones

- 9.1. Instruir a las autoridades competentes (SENASA, Ministerio de Salud, INCIENSA) en la importancia de incluir los virus de WNV y SLEV dentro los diferenciales en casos de enfermedad febril asociada a arbovirosis.
- 9.2. Implementar la técnica de PRNT 90% para confirmar casos sospechosos de WNV.
- 9.3. Educar a la población en la importancia de utilizar medidas preventivas para disminuir la posibilidad de contagio.
- 9.4. Implementar un plan de vigilancia integrado que involucre a los diferentes sectores (SENASA, Ministerio de Salud, INCIENSA y laboratorios particulares) que realicen diagnóstico de arbovirosis de manera que promueva una comunicación asertiva y que permita la notificación temprana de casos sospechosos.
- 9.5. Desarrollar protocolos estándar de colecta, análisis de las muestras, así como de la difusión de la información.

10. Condiciones éticas y de financiamiento

Para el desarrollo de este estudio se contó con el permiso del CICUA (CICUA-042-17), la Comisión de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica (VI-2994-2017), Comité Ético Científico (CEC-O-04), Sistema Nacional de Áreas de Conservación: Área de Conservación Tempisque, Programa de Investigación y Monitoreo Ecológico (Oficio-ACT-PIM-070-17) y Área de Conservación La Amistad-Caribe (M-PC-SINAC-PNI-ACLAC-047-2018).

Los doctores Eugenia Corrales Aguilar y Claudio Soto Garita fueron las personas encargadas de tomar las muestras humanas y se encuentran debidamente acreditados ante el CONIS. El doctor Luis Mario Romero Vega y mi persona somos médicos veterinarios colegiados.

El proyecto de investigación se financió mediante el proyecto Pry01-306-2018-Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seroepidemiológicos de Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica, Plan Piloto de la Universidad de Costa Rica y el proyecto 8009 EU H2020: Murciélagos y roedores en ambientes peridomiciliares: ¿Posibles reservorios de zika?. Además, se cuenta con financiamiento del FEES-CONARE 2018 “Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores (*Aedes aegypti*, *Culex sp*), reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología de Zika, Chikungunya y otros arbovirus en dos localidades endémicas a Dengue, Encefalitis Equina Venezolana y Virus del Oeste del Nilo.

11. Referencias

1. Brinton MA. 2002. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol* 56:371–402.
2. Castillo-Olivares J, Wood J. 2004. West Nile virus infection of horses. *Vet Res* 35:467–483.
3. Goo L, VanBlargan LA, Dowd KA, Diamond MS, Pierson TC. 2017. A single mutation in the envelope protein modulates flavivirus antigenicity, stability, and pathogenesis. *PLOS Pathog* 13:e1006178.
4. Chao LH, Klein DE, Schmidt AG, Peña JM, Harrison SC. 2014. Sequential conformational rearrangements in flavivirus membrane fusion. *Elife* 3:e04389.
5. Mendes YS, Alves NS, Souza TLF, Sousa IP, Bianconi ML, Bernardi RC, Pascutti PG, Silva JL, Gomes AMO, Oliveira AC. 2012. The Structural Dynamics of the Flavivirus Fusion Peptide–Membrane Interaction. *PLoS One* 7:e47596.
6. Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, Bowen M, McKinney N, Morrill WE, Crabtree MB, Kramer LD, Roehrig JT. 2002. Complete Genome Sequences and Phylogenetic Analysis of West Nile Virus Strains Isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology* 298:96–105.
7. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode A V., Campbell GL. 2005. Virology, Pathology, and Clinical Manifestations of West Nile Virus Disease. *Emerg Infect Dis* 11:1174–1179.
8. Smithburn KC, Hughes TP, Burke a W, Paul JH. 1940. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda 1. *Am J Trop Med Hyg* s1-20:471–492.
9. Anis E, Grotto I, Mendelson E, Bin H, Orshan L, Gandacu D, Warshavsky B, Shinar E, Slater PE, Lev B. 2014. West Nile fever in Israel: The reemergence of an endemic disease. *J Infect* 68:170–175.

10. Bassal R, Shohat T, Kaufman Z, Mannasse B, Shinar E, Amichay D, Barak M, Bendor A, Bar Haim A, Cohen D, Mendelson E, Lustig Y. 2017. The seroprevalence of West Nile Virus in Israel: A nationwide cross sectional study. *PLoS One* 12:e0179774.
11. Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, Singer DA, Nash D, Cooper MJ, Katz N, Liljebjelke KA, Biggerstaff BJ, Fine AD, Layton MC, Mullin SM, Johnson AJ, Martin DA, Hayes EB, Campbell GL. 2001. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet* 358:261–264.
12. Murray KO, Mertens E, Desprès P. 2010. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res* 41:41–67.
13. Jia X-Y, Briese T, Jordan I, Rambaut A, Chang Chi H, Mackenzie JS, Hall RA, Scherret J, Lipkin WI. 1999. Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *Lancet* 354:1971–1972.
14. Trock SC, Meade BJ, Glaser AL, Ostlund EN, Lanciotti RS, Cropp BC, Kulasekera V, Kramer LD, Komar N. 2001. West Nile Virus Outbreak Among Horses in New York State, 1999 and 2000. *Emerg Infect Dis* 7:745–747.
15. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ. 1999. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* (80-) 286:2333–7.
16. Komar N, Clark GG. 2006. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica* 19:112–7.
17. Mattar S, Komar N, Young G, Alvarez J, Gonzalez M. 2011. Seroconversion for West Nile and St. Louis encephalitis viruses among sentinel horses in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:976–979.

18. Dupuis AP, Marra PP, Kramer LD. 2003. Serologic evidence of West Nile virus transmission, Jamaica, West Indies. *Emerg Infect Dis* 9:860–863.
19. Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Beasley DWC, Coffey L, Carrara AS, Da Rosa AT, Clements T, Wang E, Ludwig G V., Campomanes Cortes A, Paz Ramirez P, Tesh RB, Barrett ADT, Weaver SC. 2003. West Nile Virus in Mexico: Evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis* 9:1604–1607.
20. Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, Gutierrez G, Pigretti S, Menchaca H, Garrido N, Taylor N, Fernandez F, Levis S, Enría D. 2006. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis* 12:1559–1561.
21. Drebot MA, Lindsay R, Barker IK, Buck PA, Fearon M, Hunter F, Sockett P, Artsob H. 2003. West Nile virus surveillance and diagnostics: A Canadian perspective. *Can J Infect Dis* 14:105–114.
22. Gubler DJ. 2007. The continuing spread of West Nile Virus in the western hemisphere. *Clin Infect Dis* 45:1039–1046.
23. Morales-Betoulle ME, Komar N, Panella NA, Álvarez D, López MR, Betoulle J, Sosa SM, Muller ML, Kilpatrick A., Lanciotti RS, Jonhson BW. 2013. West Nile Virus ecology in a tropical ecosystem in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 88:116–126.
24. Stiles G, Skutch A. 2007. *Guía de Aves de Costa Rica*. Cornell University press.
25. Farfan-Ale JA, Blitvich BJJ, Marlenee NLNL, Loroño-Pino MA, Puerto-Manzano F, Garcia-Rejon JE, Rosado-Paredes EPEP, Flores-Flores LFLF, Ortega-Salazar A, Chavez-Medina J, Cremieux-Grimaldi JCJC, Correa-Morales F, Hernandez-Gaona G, Méndez-Galvon JF, Beaty BJJ, Loroño-Pino M a, García-Rejón JE, Chávez-Medina J, Hernández-Gaona G, Méndez-Galván JF. 2006. Antibodies to West Nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 74:908–914.
26. Chaves A, Sotomayor-Bonilla J, Monge O, Ramírez A, Galindo F, Sarmiento-Silva RE, Gutiérrez-Espeleta GA, Suzán G. 2016. West Nile Virus in resident birds from

- Yucatan, Mexico. *J Wildl Dis* 52:159–163.
27. Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E. 2012. West Nile virus: Biology, transmission, and human infection. *Clin Microbiol Rev* 25:635–648.
 28. Wilson AJ, Morgan ER, Booth M, Norman R, Perkins SE, Hauffe HC, Mideo N, Antonovics J, McCallum H, Fenton A. 2017. What is a vector? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372:1–11.
 29. Hamer GL, Kitron UD, Brawn JD, Loss SR, Ruiz MO, Goldberg TL, Walker ED. 2008. *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): A bridge vector of West Nile Virus to humans. *J Med Entomol* 45:125–128.
 30. Smith JL, Fonseca DM. 2004. Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* 70:339–345.
 31. Huang ZYX, de Boer WF, van Langevelde F, Olson V, Blackburn TM, Prins HHT. 2013. Species' life-history traits explain interspecific variation in reservoir competence: A possible mechanism underlying the dilution effect. *PLoS One* 8:1–6.
 32. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. 2003. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg Infect Dis* 9:311–322.
 33. Reisen WK, Fang Y, Martinez VM. 2005. Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis Encephalitis Virus transmission. *J Med Entomol* 42:367–375.
 34. Duggal NK, Bosco-Lauth A, Bowen RA, Wheeler SS, Reisen WK, Felix TA, Mann BR, Romo H, Swetnam DM, Barrett ADT, Brault AC. 2014. Evidence for Co-evolution of West Nile Virus and House Sparrows in North America. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3262.
 35. Grubaugh ND, Fauver JR, Rückert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna S, Murrieta RA, Gendernalik A, Smith DR, Brackney DE, Ebel GD. 2017. Mosquitoes Transmit

- Unique West Nile Virus Populations during Each Feeding Episode. *Cell Rep* 19:709–718.
36. Fechter-Leggett E, Nelms BM, Barker CM, Reisen WK. 2012. West Nile virus cluster analysis and vertical transmission in *Culex pipiens* complex mosquitoes in Sacramento and Yolo Counties, California, 2011. *J Vector Ecol* 37:442–449.
 37. Ciota AT. 2017. West Nile virus and its vectors. *Curr Opin Insect Sci* 22:28–36.
 38. Winston DJ, Vikram HR, Rabe IB, Dhillon G, Mulligan D, Hong JC, Busuttil RW, Nowicki MJ, Mone T, Civen R, Tecle SA, Trivedi KK, Hocevar SN. 2014. Donor-Derived West Nile Virus Infection in Solid Organ Transplant Recipients. *Transplantation* 97:881–889.
 39. Montgomery RR. 2017. Age-related alterations in immune responses to West Nile virus infection. *Clin Exp Immunol* 187:26–34.
 40. Watson JT, Pertel PE, Jones RC, Siston AM, Paul WS. 2004. Clinical characteristics and functional outcomes of West Nile fever. *Ann Intern Med* 141:360–365.
 41. Murray KO, Garcia MN, Rahbar MH, Martinez D, Khuwaja SA, Arafat RR, Rossmann S. 2014. Survival analysis, long-term outcomes, and percentage of recovery up to 8 years post-infection among the Houston West Nile virus cohort. *PLoS One* 9:3–10.
 42. Hobson-Peters J, Arévalo C, Cheah WY, Blitvich BJ, Tan CSE, Sandis A, Araya LN, Hernández JL, Tuye P, Hall RA. 2011. Detection of antibodies to West Nile Virus in horses, Costa Rica, 2004. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 11:1081–1084.
 43. Johnson AJ, Martin DA, Karabatsos N, Roehrig JT. 2000. Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 38:1827–1831.
 44. Ebel GD, Dupuis AP, Nicholas D, Young D, Maffei J, Kramer LD. 2002. Detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to West Nile virus in birds.

Emerg Infect Dis 8:979–982.

45. Jiménez C, Romero M, Baldi M, Piche M, Alfaro A, Chaves A, Morales J, Leon B, Hutter S, Corrales E. 2016. Arboviral infections (Eastern equine encephalitis, Western equine encephalitis, Venezuelan equine encephalitis and West Nile encephalitis) in horses of Costa Rica. *J Equine Vet Sci* 39:S31.
46. Jiménez C, Romero M, Piche M, Baldi M, Alfaro A, Chaves A, Morales J, León B, Hutter S, Corrales-Aguilar E. 2016. Arboviral encephalitis in Costa Rican horses: 2009-2016. *Int J Infect Dis* 53:153.
47. Hutter S, Baldi M, Firth CL, León B, Käsbohrer A, Jimenez C. 2016. Seroprevalence and risk factors for equine arboviral infections (Eastern Equine Encephalomyelitis, Western Equine Encephalomyelitis, Venezuelan Equine Encephalomyelitis and West Nile Fever) in Costa Rica. *Int J Infect Dis* 53:59.
48. Beasley DWC, McAuley AJ, Bente DA. 2015. Yellow fever virus: Genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. *Antiviral Res* 115:48–70.
49. Mather S, Scott S, Temperton N, Wright E, King B, Daly J. 2013. Current progress with serological assays for exotic emerging/re-emerging viruses. *Future Virol* 8:745–755.
50. Zuchi N, Da Silva Heinen LB, Dos Santos MAM, Pereira FC, Silhessarenko RD. 2014. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109:820–823.
51. Lustig Y, Sofer D, Bucris ED, Mendelson E. 2018. Surveillance and diagnosis of west nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity. *Front Microbiol* 9:1–10.
52. Aguilar P V, Estrada-franco JG, Navarro-lopez R, Ferro C, Haddow AD, Weaver SC. 2011. Hidden under the dengue umbrella. *Future Virol* 6:721–740.
53. Weingartl HM, Drebot MA, Hubálek Z, Halouzka J, Andonova M, Dibernardo A, Cottam-Birt C, Larence J, Marszal P. 2003. Comparison of assays for the detection

- of West Nile virus antibodies in chicken serum. *Can J Vet Res* 67:128–132.
54. Medlin S, Deardorff ER, Hanley CS, Vergneau-Grosset C, Siudak-Campfield A, Dallwig R, da Rosa AT, Tesh RB, Martin MP, Weaver SC, Vaughan C, Ramirez O, Sladky KK, Paul-Murphy J. 2016. Serorvey of selected arboviral pathogens in free-ranging, two-toed sloths (*Choloepus Hoffmanni*) and three-toed sloths (*Bradypus variegatus*) in Costa Rica, 2005-2007. *J Wildl Dis* 52:883–892.
 55. Romero-Vega M. 2015. Aislamiento y filogenia de Alfavirus: Encefalitis Equina del Este, Encefalitis Equina del Oeste, Encefalitis Equina Venezolana (Togaviridae) y Flavivirus: Virus del Oeste del Nilo (Flaviviridae) en muestras de aves silvestres de zonas con brotes de enferm. Universidad Nacional.
 56. Dolz G, Chaves A, Gutiérrez-Espeleta GA, Ortiz-Malavasi E, Bernal-Valle S, Herrero MV. 2019. Detection of antibodies against flavivirus over time in wild non-human primates from the lowlands of Costa Rica. *PLoS One* 14:e0219271.
 57. Soto-Garita C, Somogyi T, Vicente-Santos A, Corrales-Aguilar E. 2016. Molecular characterization of two major dengue outbreaks in Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg* 95:201–205.
 58. Vargas M. 1998. El mosquito un enemigo peligroso (Diptera: Culicidae). Editorial Universidad de Costa Rica, San José.
 59. Seaman BS, Schulze CH. 2010. The importance of gallery forests in the tropical lowlands of Costa Rica for understorey forest birds. *Biol Conserv* 143:391–398.
 60. Darsie R. 1993. Key to mosquitoes of Costa Rica (Diptera: Culicidae). International Center for Disease Control, Columbia, University of South Carolina.
 61. Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, Greenacre C, Gwaltney-Brant S, McCrackin MA, Meyer R, Miller D, Shearer J, Yanong R. 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition, p. 78–80. *In AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition.*
 62. Sánchez MD, Pierson TC, DeGrace MM, Mattei LM, Hanna SL, Del Piero F, Doms

- RW. 2007. The neutralizing antibody response against West Nile virus in naturally infected horses. *Virology* 359:336–348.
63. Komar N, Panella N, Burns JE, Dusza SW, Mascarenhas TM, Talbot TO. 2001. Serologic Evidence for West Nile Virus Infection in Birds in the New York City Vicinity During an Outbreak in 1999. *Emerg Infect Dis* 7:621–623.
64. Komar N, Langevin S, Monath TP. 2009. Use of a surrogate chimeric virus to detect West Nile virus-neutralizing antibodies in avian and equine sera. *Clin Vaccine Immunol* 16:134–135.
65. Migné C, Lecollinet S, Zientara S, Lowenski S, Dumarest M, Gonzalez G, Debergé E, Desoutter D, Vanhomwegen J, Beck C, Durand B, Bichet H, Leparç-Goffart I. 2019. Serological evidence of infection with dengue and Zika viruses in horses on French Pacific Islands. *PLoS Negl Trop Dis* 13:e0007162.
66. Sutherland GL, Nasci RS. 2007. Detection of West Nile virus in large pools of mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 23:389–395.
67. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, Komar N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, Roehrig JT. 2000. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 38:4066–4071.
68. Scaramozzino N, Crance J-M, Jouan A, DeBriel D, Stoll F, Garin D. 2001. Comparison of Flavivirus Universal Primer Pairs and Development of a Rapid, Highly Sensitive Heminested Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Flaviviruses Targeted to a Conserved Region of the NS5 Gene Sequence. *J Clin Microbiol* 39:1922–1927.
69. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X : Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Evol Genet Anal across Comput platforms* 35:1547–1549.
70. Johnson DJ, Ostlund EN, Pedersen DD, Schmitt BJ. 2001. Detection of North

- American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Emerg Infect Dis* 7:739–741.
71. Townzen JS, Brower AVZ, Judd DD. 2008. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. *Med Vet Entomol* 22:386–93.
 72. Wong-Mcclure R, Suárez-Pérez M, Badilla-Vargas X. 2007. Estudio de la estacionalidad del dengue en la Costa Pacífica de Costa Rica. *Acta Med Costarric* 49:36–39.
 73. La Sorte FA, Fink D, Hochachka WM, Kelling S. 2016. Convergence of broad-scale migration strategies in terrestrial birds. *Proc R Soc B Biol Sci* 283:20152588.
 74. Patiris PJ, Ocegüera L, Peck GW, Chiles RE, Reisen WK, Hanson C. 2008. Serologic Diagnosis of West Nile and St Louis Encephalitis Virus Infections in Domestic Chickens. *Am J Trop Med Hyg* 78:434–441.
 75. Martín-Acebes MA. 2012. West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. *World J Virol* 1:51–70.
 76. Maharaj PD, Bosco-Lauth AM, Langevin SA, Anishchenko M, Bowen RA, Reisen WK, Brault AC. 2018. West Nile and St. Louis encephalitis viral genetic determinants of avian host competence. *PLoS Negl Trop Dis* 12:1–17.
 77. Llorente F, García-Irazábal A, Pérez-Ramírez E, Cano-Gómez C, Sarasa M, Vázquez A, Jiménez-Clavero MÁ. 2019. Influence of flavivirus co-circulation in serological diagnostics and surveillance: a model of study using West Nile, Usutu and Bagaza viruses. *Transbound Emerg Dis* 1–7.
 78. Aguirre A, Zavala AA. 2019. West Nile Virus Prevalence in Wild Birds from Mexico. *J Wildl Dis* 55:425–431.
 79. Hartmann CA, Vikram HR, Seville MT, Orenstein R, Kusne S, Blair JE, Grys TE, Patron RL. 2017. Neuroinvasive St. Louis Encephalitis Virus Infection in Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant* 17:2200–2206.

80. Lopez H, Neira J, Morales MA, Fabbri C, D'Agostino ML, Zitto T. 2010. Encefalitis por virus de San Luis en la ciudad de Buenos Aires durante el brote de Dengue 2009. *Med (Buenos Aires)* 70:247–250.
81. Chiu CY, Coffey LL, Murkey J, Symmes K, Sample HA, Wilson MR, Naccache SN, Arevalo S, Somasekar S, Federman S, Stryke D, Vespa P, Schiller G, Messenger S, Humphries R, Miller S, Klausner JD. 2017. Diagnosis of fatal human case of St. Louis encephalitis virus infection by metagenomic sequencing, California, 2016. *Emerg Infect Dis* 23:1694–1698.
82. Borges L, Zuchi N, Serra OP, Cardoso BF. 2015. Saint Louis Encephalitis Virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 57:215–220.
83. Hoyos-López R, Soto SU, Rúa-Uribe G, Gallego-Gómez JC. 2015. Molecular identification of Saint Louis encephalitis virus genotype IV in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:719–725.
84. Rosa R, Costa EA, Marques RE, Oliveira TS, Furtini R, Bomfim MRQ, Teixeira MM, Paixão TA, Santos RL. 2013. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2537.
85. Diaz LA, Ré V, Almirón WR, Farías A, Vázquez A, Sanchez-Seco MP, Aguilar J, Spinsanti L, Konigheim B, Visintin A, García J, Morales MA, Tenorio A, Contigiani M. 2006. Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg Infect Dis* 12:1752–1754.
86. Auguste AJ, Pybus OG, Carrington CVF. 2009. Evolution and dispersal of St. Louis encephalitis virus in the Americas. *Infect Genet Evol* 9:709–715.
87. Morse W, Izenour K, McKenzie B, Lessard S, Zohdy S. 2019. Perceptions and practices of mosquito-borne diseases in Alabama – is concern where it should be? *BMC Public Health* 19:987.
88. Dente MG, Riccardo F, Bolici F, Colella NA, Jovanovic V, Drakulovic M, Vasic M, Mamlouk H, Maazaoui L, Bejaoui M, Zakhshvili K, Kalandadze I, Imnadze P, Declich S, Knjeginic V, Stojkovic B, Labus T, Milicevic V, Veljovic L, Maksimovic-

Zoric J, Stoiljkovic V, Svetlana Filipovic Vignjevic, Protic J, Zgomba M, Petric D, Despot D, Pesic B, Serovic K, Aleksic I, Djuric I, Ilic D, Vrga S, Pavlovic L, Plavska D, Grego E, Dr Milan Jovanović Batut, Harabech K, Ministère de la Santé Publique, Nissaf Ben Alaya, Bougatef S, Triki H, Bouattour A, Rebhi M, Daaboub J, Somai L, Zerlli M, Oukaili K, Heni Haj Ammar, Sghaier C, Fatnassi N, Kalthoum S, Dhaouadi A, Abdelhak Ben Youness, Mahale I, Marzouk M, Sassi Ben Bdira, Grira S, Ayadi S, Mastouri, Faten A, Abdelkader B, Chakhunashvili G, Babuadze G, Mamuchishvili N, Chanturia G, Adeishvili E, Avaliani L, Ninidze L, Kartskhia N, Gulbani A, Kokhraidze M, Donduashvili M, Kekelidze A. 2019. Implementation of the One Health approach to fight arbovirus infections in the Mediterranean and Black Sea Region: Assessing integrated surveillance in Serbia, Tunisia and Georgia. *Zoonoses Public Health* 66:276–287.

12. Anexos

12.1. Permiso del CICUA-042-17

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDO Y USO DE ANIMALES**

24 de mayo de 2017
CICUA-042-17


Dra. Eugenia Corrales Aguilar
CIET

Estimada señora:

El Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales (CICUA), en su sesión 165, del 18 de mayo del año en curso, valoró las aclaraciones en el proyecto "Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seroepidemiológicos del Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica, Plan Piloto de la Universidad de Costa Rica (UCR)".

Se aceptan las aclaraciones con lo cual queda aprobado dicho proyecto.

Atentamente,


Dra. Sara González Camacho
Coordinadora
CICUA

Cc: Dr. Fernando García, Vicerrector de Investigación
— Archivo

12.2. Comisión de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica



72
VI Vicerrectoría de Investigación

16 de mayo de 2017
VI-2994-2017



Dra. Eugenia Corrales Aguilar
Investigadora
CIET

Estimada señora:

De conformidad con lo dispuesto en el "Reglamento sobre el Acceso a la Biodiversidad en Actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación en la Universidad de Costa Rica", la Comisión Institucional de Biodiversidad revisó el proyecto "**Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seroepidemiológicos de Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica, Plan Piloto de la Universidad de Costa Rica (UCR)**", el cual se encuentra bajo su coordinación.

Le comunico que la Comisión Institucional de Biodiversidad aprobó el permiso de acceso a los elementos de la biodiversidad que se indican en su proyecto de investigación. Por esta razón le envío la Resolución #096 de la Comisión mediante la cual se le comunican las condiciones con que se aprueba este permiso de acceso.

Le saluda con toda consideración,



M.Sc. Jorge Warner
Coordinador
Comisión Institucional de Biodiversidad

JW/lf

C. Dario Hernández Castro, Gestor, VI
Consejo Científico del CIET
Licda. Silvia Salazar F., PROINNOVA
Archivo/Comisión de Biodiversidad

12.3. Comité Ético Científico



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

VI Vicerrectoría de
Investigación

12 de junio de 2017
VI-4050-2017

Dra. Eugenia Corrales
Investigadora
Centro de Investigaciones en Estudios Tropicales

El Comité Ético Científico (CEC) en su sesión No.63, celebrada el 7 de junio de 2017 sometió a consideración el Proyecto de investigación "Dinámica de la arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seropidemiológicos de Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica".

Después del análisis respectivo, el Comité acuerda:

ACUERDO N°4: Declarar aprobado el proyecto de investigación "Dinámica de la arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seropidemiológicos de Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica" de la investigadora Dra. Eugenia Corrales

Quedamos en la entera disposición de colaborar ante cualquier consulta.

Sin más por el momento, se suscribe cordialmente,

M.Sc. Alfonso Chacón Mata
Presidente Comité Ético Científico



dha
C.c. Ph.D. Esteban Chaves Olarte, Director CIET
M.Sc. Anayansy Cerdas, Gestora de proyectos VI
Archivo/consecutivo.



12.4. Sistema Nacional de Áreas de Conservación: Área de conservación Tempisque, Programa de Investigación y Monitoreo Ecológico



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
 AREA DE CONSERVACIÓN TEMPISQUE
 DIRECCIÓN TÉCNICA
 PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN Y MONITOREO ECOLÓGICO



09 de agosto de 2017
ACT-PIM-070-17

Señor
 Luis Mario Romero Vega
 Investigador
 Universidad de Costa Rica

ASUNTO: Trámite de permiso investigación

Estimado señor:

El pasado 07 de julio de 2017 me ingresó una solicitud suya para un permiso de investigación y colecta científica, procedente de la Secretaría Ejecutiva del SINAC.

En relación con el proyecto, el cual incluye acceso genético en su metodología, debo indicarle que su solicitud no es procedente.

Lo anterior en razón del marco normativo que rige su investigación: el Reglamento sobre el acceso a la biodiversidad en actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación de la Universidad de Costa Rica, Resolución N° 5861-2005, publicado en el Alcance a La Gaceta N° 9-2005.

Por otra parte, debido a que los sitios de colecta identificados en el territorio del Área de Conservación Tempisque están fuera de nuestras áreas silvestres protegidas, tampoco procede un permiso de ingreso.

Cordialmente;

Firmado por: ROBERTO ZUÑIGA MUÑOZ (FIRMA)
 Motivo: FIRMA DIGITAL / LIC. ROBERTO ZUNIGA MUÑOZ
 Localización: ACT - SINAC - MINAE
 Fecha y hora: 09.08.2017 09:59:41
 Lic. Roberto Zúñiga Muñoz
Coordinador, Investigación y Monitoreo Ecológico

RZM / rzm / Sustantivos / Investigación y Monitoreo / Coordinación*09.08.2017

C: Mauricio Méndez Venegas Director Técnico ACT
 Lourdes Vargas Fallas Gestora PI-SINAC
 Archivo de Gestión

Dirección: Hojancha, Guanacaste, diagonal esquina sureste
 Iglesia Católica
 www.actempisque.org
 TELEFAX (506)2659 81 90, 2659 81 93, 2659 93 69



12.5. Sistema Nacional de Áreas de Conservación: Área de Conservación La Amistad-Caribe



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018
Página 4 de 9

DÉCIMO TERCERO: Que de conformidad con el criterio de la Secretaría Técnica Nacional Ambiental (SETENA), según acuerdo ACP-70-2015, del 23 de junio de 2015, de la Sesión Ordinaria 088-2015-SETENA de su Comisión Plenaria, la evaluación de impacto ambiental no resulta de aplicación para los permisos de investigación ni las licencias de colecta científica o académica, a que se refiere el numeral 26 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre 7317.

DECIMO CUARTO: Que los objetivos de la investigación concuerdan con los objetivos de conservación del SINAC-MINAE, detallados en su Plan Estratégico respectivo cuando procede; así como en los objetivos de investigación que se enmarcan en la Estrategia Nacional de Investigación.

DÉCIMO QUINTO: Que las personas físicas o jurídicas que acrediten personal de apoyo al proceso de investigación deberán especificar la condición de dicho personal (asistentes). En caso de manejo de vida silvestre únicamente lo podrá realizar las personas que sean acreditadas por el investigador como asistentes de la investigación y que se encuentren facultadas para tal manejo según los fines y métodos de la investigación. Se aclara que en el caso de colaboradores que participen del proyecto de investigación en forma ad honorem (como voluntarios), por tratarse de una relación entre particulares, esta no se encuentra regulada por la normativa del Decreto de voluntariado del SINAC vigente, Decreto Ejecutivo N° 36812.

Por tanto,



El Programa de Investigación del Área de Conservación La Amistad – Caribe

RESUELVE:

PRIMERO: Aprobar la solicitud presentada por Luis Mario Romero Vega, documento de identidad N° 1-1429-0716, para desarrollar la investigación científica "Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores (*Aedes aegypti*, *Culex* sp., etc.), reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología de Zika, Chikungunya y otros arbovirus en dos localidades endémicas a Dengue, Encefalitis Equina Venezolana y Virus del Oeste del Nilo", con el objetivo principal de: - Analizar la dinámica de las arbovirosis en Costa Rica mediante el estudio de vectores, posibles reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología del virus Zika, Chikungunya y otras arbovirosis en dos áreas endémicas para mejorar la comprensión y profilaxis de estas infecciones en humanos y animales domésticos. Los objetivos específicos de: - Complementar el cuadro epidemiológico de Alfa y Flavivirus en dos localidades de Costa Rica para mejorar el conocimiento de las arbovirosis en nuestro medio. - Brindar apoyo al sector salud y veterinario para el diagnóstico de las arbovirosis causadas por Flavivirus y Alfavirus. - Realizar análisis filogenético Bayesiano de



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica

12.6. Acreditación ante el CONIS: Dra. Eugenia Corrales Aguilar

CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACION EN SALUD (CONIS)

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN

CODIGO N° 270 - 2016

Como Investigador(a) Principal Estudios Observacionales a::

Eugenia Corrales Aguilar

Por cumplir con los requisitos establecidos en:
la Ley No. 9234 Reguladora de Investigación Biomédica
y su Reglamento No. 39061-5

APROBADO EN SESIÓN CONIS NO. 59 DEL 25 DE mayo DEL 2016
(NÚMERO) (DÍA) (MES) (AÑO)

Válido hasta el: 25 de mayo del 2019
(DÍA) (MES) (AÑO)



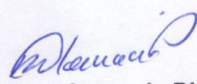
Dr. Fernando Llorca Castro
Presidente CONIS / Ministro de Salud



12.7. Autorización ante el CONIS: Dr. Claudio Soto Garita**CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACION EN SALUD
CONIS****A QUIEN INTERESE**

La Secretaría Técnica Ejecutiva del CONIS hace constar que Claudio Soto garita ha sido acreditado como Sub-investigador con el código 318-2016, por el Consejo Nacional de Investigación en Salud CONIS, en su sesión del 29 de junio 2016 Acta No. 64. El certificado se encuentra en proceso de elaboración.

Dado en la ciudad de San José a los 05 días del mes de octubre de 2016.


Dra. Melany Ascencio Rivera
Secretaria Técnica Ejecutiva
CONIS

