

## *Limitaciones para el serodiagnóstico del virus del oeste del Nilo en zonas endémicas con co-circulación de Flavivirus en el Caribe colombiano*

Salim Máttar, Ph.D.<sup>1</sup>, Miguel Parra, M.Sc.<sup>2</sup>, José Torres, Microbiol.<sup>3</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** Esta es la primera aproximación sero-epidemiológica que se hace en Colombia sobre el virus del Oeste del Nilo (VON).

**Objetivo:** El propósito de este estudio fue el de establecer la presencia de anticuerpos IgG contra el VON en una población de la costa atlántica utilizando dos pruebas comerciales y establecer su utilidad.

**Materiales y método:** Se analizaron de forma aleatoria 52 muestras de sueros de personas que trabajaban en labores agrícolas desde hacia más de 15 años en el departamento de Sucre. Se utilizó la técnica West Nile Virus IgG ELISA (Focus Technologies). También se utilizó la prueba de inmunofluorescencia (PANBIO Columbia. Arbovirus IgG-IFA slides), donde se evaluó la detección de anticuerpos contra cinco antígenos diferentes de arbovirus (encefalitis equina venezolana, encefalitis japonesa, fiebre amarilla y dengue).

**Resultados:** Con la prueba de ELISA, de 52 sueros estudiados para la detección de anticuerpos contra VON, 38 (73%) resultaron positivos, los 14 (27%) restantes resultaron negativos. Con la prueba de IFA, 6 sueros (11.5%) resultaron seropositivos débiles para VON, 46 (88.5%) resultaron negativos para la detección de anticuerpos contra el VON. Utilizando IFA se presentaron reacciones cruzadas contra otros arbovirus como dengue, encefalitis venezolana y japonesa y fiebre amarilla. El estudio demostró la complejidad del serodiagnóstico de Flavivirus en las zonas endémicas como la del Caribe colombiano.

**Conclusión:** Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que las pruebas de ELISA e IFA para humanos son de poca utilidad diagnóstica contra el VON en las zonas colombianas donde se presentan circulación de otros *Flavivirus* como dengue, fiebre amarilla o encefalitis equina.

**Palabras clave:** *Virus del Nilo; Colombia; Serodiagnóstico; Seroreacciones; Flavivirus; West Nile Virus.*

### *Limitations for the serodiagnosis of the West of the Nile virus infection in endemic zones with co-circulation of Flavivirus in the Colombian Caribbean area*

### SUMMARY

**Introduction:** This is the first sero-epidemiologic approximation done in Colombia about West Nile virus (WNV).

**Objective:** The purpose of this study was to detect IgG antibodies against WNV in a population by using two commercial tests and to establish its utility in our medium.

**Materials and methods:** It was analyzed by random way 52 serum samples of people whom worked in agricultural practices 15 years ago in the department of Sucre. The technique West Nile Virus IgG ELISA (Focus Technologies) was used. Furthermore, the test IFA (PANBIO Columbia, Arbovirus IgG- IFA slides) which detect antibodies against five antigens (equine encephalitis, Japanese encephalitis, yellow fever and dengue) was hence used. With ELISA test of 52 serum samples studied for the detection of antibodies against WNV, 38 (73%) were positive, the remaining 14 (27%) were negatives. With IFA test, 6 sera (11.5%) showed weak seropositive reaction, 46 (88.5%) were seronegatives for the detection of antibodies against the WNV. By using IFA different cross reactions were observed against other arbovirus as dengue, Venezuelan encephalitis, Japanese encephalitis and yellow fever. The study showed the complexity of the serodiagnostic of the *Flavivirus* in the endemic zones as the Caribbean Colombian area.

**Conclusion:** The results obtained in this study show that the tests of ELISA and IFA are not of diagnostic utility against the WNV in Colombia, or at least in the zones where *Flavivirus* are actually in circulation as dengue, yellow fever or equine encephalitis.

**Key words:** *West Nile Virus; Colombia; Serodiagnostic; Cross reaction; Flavivirus.*

1. Profesor Titular, Microbiología e Infectología, Facultad de Medicina Veterinaria, Director Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. e-mail:smattar@escarsa.net.co, mattarsalim@hotmail.com
  2. Profesor Asociado, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. e-mail: miguelnando@yahoo.com
  3. Microbiólogo, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.
- Recibido para publicación septiembre 29, 2004 Aprobado para publicación junio 27, 2005

La fiebre por el virus del oeste del Nilo (VON), es una infección zoonótica transmitida por mosquitos vectores de varios géneros a los vertebrados equinos, bovinos, caninos, aves y humanos. El VON es un microorganismo neurotrópico y junto con el virus de la encefalitis japonesa, el dengue, el virus del Valle Murray y otros, están incluidos en el género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*<sup>1-4</sup>. La transmisión del virus se presenta en ciclos naturales que incluyen diferentes tipos de mosquitos ornitófilos del género *Culex*. Los humanos, caballos y otros mamíferos, se consideran huéspedes finales de la infección, pues la viremia que se alcanza en ellos no es suficiente para seguir contaminando otros mosquitos y el ciclo se detiene. La infección del VON en humanos y caballos es por lo general asintomática, se caracteriza por procesos febriles, dolor de cabeza, erupción, mialgias, artralgias y fatiga, sin embargo, la infección puede evolucionar hasta producir encefalitis o meningoencefalitis, llevando al paciente incluso hasta la muerte<sup>1-5</sup>.

El VON fue aislado originalmente en Uganda en 1937<sup>1</sup>, de una mujer adulta que presentaba fiebre de origen desconocido; desde ese momento el virus se ha informado en África, Medio Oriente, Asia, el sur de Europa, Australia y Norte América. Recientemente se ha encontrado evidencia serológica en caballos y aves en la región norte de México<sup>5</sup>, Jamaica<sup>6</sup>, República Dominicana<sup>7</sup> y Guadalupe<sup>8</sup>. La identificación del VON en el continente americano se llevó a cabo en Nueva York<sup>2,3</sup>, luego de que se empezaran a presentar muertes de aves exóticas en los zoológicos, cuervos y caballos<sup>1-4</sup>. La epidemia por VON se diseminó rápido en los Estados Unidos; desde el año 2003, el CDC de Atlanta ha informado cerca de 10.400 casos de infección por VON en humanos distribuidos en casi todos los estados de la unión americana y alrededor de 666 han sido fatales<sup>9</sup>.

De otro lado, es conocido que los arbovirus (*Flaviviridae*) pueden presentar reacción cruzada entre ellos<sup>1-3,10-13</sup>. Colombia posee zonas endémicas para dengue (DEN), fiebre amarilla (FA) y virus de la encefalitis equina venezolana (VEE). Se desconoce sobre la presencia del VON, virus de la encefalitis de San Luis (ESL), virus de la encefalitis japonesa (VEJ) y virus de la encefalitis de Valley (VEV). Por ello, el diagnóstico compatible con la clínica y la diferenciación de los virus infectantes es importante, sobre todo en áreas donde existen *Flavivirus* circulantes como en la costa Caribe colombiana. Los estuches de diagnóstico disponibles en EE.UU. y Europa teóricamente no presentan problemas de

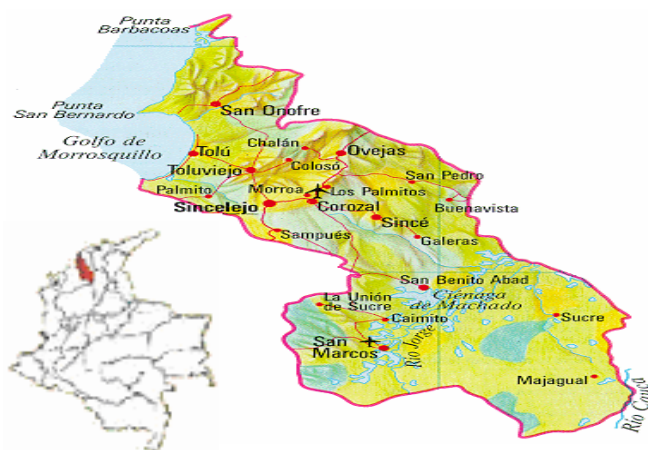
reacción cruzada por la ausencia de DEN, FA, VEE, VEJ y VEV. Sin embargo, como Colombia posee regiones con altos índices de infección por diferentes *Flavivirus*, es importante la determinación de anticuerpos y el diagnóstico diferencial mediante el uso de las pruebas de diagnóstico para VON.

De otro lado, el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt con Roselli<sup>14</sup> y Komar<sup>15</sup> del CDC han determinado que existe en Colombia aproximadamente 34 especies de aves migratorias procedentes de EE.UU. y Canadá donde se ha encontrado la presencia del VON. Por tanto, existe el riesgo y una alta probabilidad de que el virus pueda llegar a Sur América, y consecuentemente a Colombia, a través de las aves infectadas; se recomienda atención especial a las zonas de grandes extensiones de agua como las ciénagas en la costa atlántica, el sector del Darién, la costa pacífica y los Llanos. Ante esta evidencia, es importante alertar a los sistemas de vigilancia epidemiológica, la comunidad médica y los laboratorios especializados que requieren con urgencia pruebas de diagnóstico confiables para estudiar posibles brotes en humanos y que hayan sido ensayadas en condiciones locales. El propósito de este estudio fue establecer la presencia de anticuerpos IgG contra el VON en una población de la costa atlántica utilizando dos pruebas comerciales y establecer su utilidad en nuestro medio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tipo de estudio y población estudiada.** Se llevó a cabo un trabajo de tipo descriptivo en donde se analizaron de forma aleatoria 52 muestras de sueros humanos de la seroteca existente en el Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT), Montería. Las muestras se recolectaron en enero de 2004 de personas que trabajaban en actividades agrícolas desde hacia más de 15 años en el departamento de Sucre. Los sueros se congelaron a -70°C hasta su evaluación. Las actividades agrícolas a las que se dedicaban estas personas eran las del manejo de ganado y desmonte de malezas en predios rurales de diferentes sitios del departamento. De cada paciente se obtuvieron datos como edad, sexo, origen, antecedentes de enfermedades infecciosas zoonóticas, presencia de agua potable en la vivienda, grado escolar, síntomas o signos generales como fiebre, fatiga, conjuntivitis, náuseas, dolor abdominal y torácico, cefalea, diarrea, amigdalitis y complicaciones respiratorias.

**Lugar de obtención de los sueros.** Los sueros se



Mapa 1. Departamento de Sucre, Colombia. Tomado de <http://www.cybercol.com/colombia/grafdept/sucre.gif>

obtuvieron en el departamento de Sucre en los municipios de Tolu, Sampués, Sincelejo, San Marcos, Morroa, San Onofre, Coveñas, San Benito Abad, San Antonio de Palmitos, Corozal, Guaranda y San Pedro. Este departamento se encuentra localizado al noroeste de Colombia entre el río Cauca y el mar Caribe. Tiene una superficie de 10.917 km<sup>2</sup>, con una temperatura promedio anual de 30°C; un poco más de la tercera parte de su territorio es depresión inundable del bajo Magdalena-Cauca-San Jorge, caracterizada por numerosas ciénagas donde anidan aves autóctonas y migratorias provenientes del hemisferio norte, sobre todo a lo largo del río San Jorge al sudeste del departamento (Mapa 1).

**Población estudiada y cálculo del tamaño de la muestra.** La población aproximada del departamento de Sucre en 1993 era de 900.000 habitantes (51% mujeres y 49% hombres). Los trabajadores rurales se estiman cerca de 400.000, 70% de estos están en el rango de edad productiva entre 16 y 65 años. Se tomaron sueros de diferentes municipios del departamento; como se desconoce la prevalencia real de la infección por el VON en Colombia se asumió 50% de frecuencia esperada de la infección. El error máximo permisible fue de 1% y el intervalo de confianza escogido fue de 99.9%, lo que permitió analizar 16 sueros, sin embargo, se aumentó el número a 52, cifra cercana cuando se escogió un intervalo de 99% y una frecuencia de 12%. Esta última se podría asumir si se considerara que la infección en humanos es similar a la encontrada en los equinos de los departamentos de Córdoba y Sucre<sup>16</sup>.

**Aspectos éticos.** Se siguieron las normas técnicas, científicas y administrativas para la investigación en salud del Ministerio de Salud de Colombia Resolución N° 008430 del 4 de octubre de 1993. A lo largo del estudio siempre se protegió la privacidad e intimidad del individuo identificándolo con un número interno. Los datos obtenidos de los análisis se incluyeron en una base de datos y se utilizaron de forma anónima y se categorizó mediante la asignación de un número. A todos los sujetos involucrados en la investigación se les explicó verbalmente el tipo de estudio y se obtuvo su consentimiento oral y escrito. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico de la Universidad de Córdoba.

**Pruebas de inmunoensayo ELISA.** Se utilizó la técnica West Nile Virus IgG ELISA (Focus Technologies, Cypress, California, USA) que usa un antígeno recombinante del virus del oeste del Nilo<sup>11,12</sup>. Básicamente, la técnica de ELISA IgG para el VON consiste en unos pozos recubiertos con un antígeno recombinante del virus del oeste del Nilo; las muestras, los controles positivo, negativo y calibradores se diluyeron y se incubaron a temperatura ambiente (23°-26°C) por 60 minutos para permitir que los anticuerpos IgG (si están presentes), reaccionaran con el antígeno de la placa. Los sueros y controles se analizaron por duplicado. Los demás procedimientos de lavados e incubación se realizaron de acuerdo con las instrucciones técnicas descritas en el estuche. La lectura de las absorbancias se realizaron en un lector de ELISA (STAT-FAX®, Awareness Technology, USA) usando un filtro de 450 nm y como filtro de referencia 600-630 nm. El análisis de resultado se hizo mediante el uso de un índice calculado como la división de la densidad óptica ( $OD_{450-630nm}$ ) de la muestra o de los controles entre el promedio de la  $OD_{450-630nm}$  de los calibradores. El control de calidad de la prueba se realizó mediante el análisis del índice para el control positivo (1.5-3.5) y el control negativo (<0.8). Si los controles se encontraban fuera de rango, los resultados de las muestras se consideraron inválidos.

**Inmunofluorescencia indirecta.** Para la realización de esta prueba se utilizó la IFA (PANBIO Columbia, USA, *Arbovirus IFA slides*). Las láminas de IFA se usaron para las determinaciones serológica y cualitativa de anticuerpos contra Arbovirus incluyendo antígenos diferentes contra virus del oeste del Nilo, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis japonesa, virus de la fiebre amarilla y el virus del dengue. Básicamente la

IFA utiliza un antígeno de los diferentes virus antes mencionados; en todos los análisis se usó un control positivo y negativo para Arbovirus y VON. Los resultados se evaluaron comparando la fluorescencia relativa de cada uno de los pozos contra la fluorescencia relativa de los controles positivos y negativos. Las fluorescencias se evaluaron como negativo (+), débil positivo (++) , positivo (+++) y fuertemente positivo (++++). Primero se realizó un tamizaje de las muestras para determinar la positividad de cada una frente a los distintos antígenos y luego se procedió a realizar la titulación de la muestra haciendo diluciones seriadas de 1:2, 1:4, 1:6 usando el *buffer* de lavado del estuche. Se consideraron positivos los sueros cuyos títulos fueron >1:120 como se ha descrito previamente<sup>6,7</sup>. Tres investigadores realizaron la lectura de manera simultánea y se anotaron los resultados concordantes de 2 de las lecturas.

## RESULTADOS

**Determinación de anticuerpos del VON por ELISA e IFA.** Para determinar el control de calidad de la prueba de ELISA se usaron los valores de los controles positivos, negativos y calibradores. Los valores obtenidos estuvieron en el rango de los parámetros de calidad indicados por el fabricante. Con la prueba de ELISA, de 52 sueros estudiados para establecer anticuerpos IgG contra el VON, 38 (73%) resultaron positivos. Con la prueba de IFA, 6 sueros (11.5%) resultaron seropositivos débiles determinados con fluorescencia relativa de una cruz (+) o dos cruces (++) . El resto, 46 (88.5%), resultaron negativos.

**Reacciones cruzadas encontradas contra otros arbovirus utilizando IFA.** Además de los anticuerpos IgG encontrados contra el VON con la prueba de IFA, se determinaron anticuerpos contra otros arbovirus. Contra el virus del dengue 38 (73%) sueros fueron positivos, los 14 (27%) restantes resultaron negativos; en el caso del virus de la fiebre amarilla (FA) 1 (2%) suero resultó positivo y los 51 (98%) restantes no presentaron reacción. Con el virus de la encefalitis japonesa (VEJ) 1 (2%) resultó positivo y los 51 (98%) sueros restantes negativos. Finalmente, para el caso del virus de la encefalitis equina (VEE) 1 (2%) suero resultó positivo y los 51 restantes (98%) resultaron negativos. De los 38 sueros seropositivos para dengue, 6 fueron simultáneamente seropositivos con VON y uno de estos seis resultó positivo para VEJ, DEN

**Cuadro 1**  
**Reactividad cruzada entre los antígenos de VON, DEN, FA, VEJ y VEE usando la técnica de IFA y ELISA\***

Suero*	VON	Antígeno de <i>Flavivirus</i>			
		DEN	FA	VEJ	VEE
1	+	+++	-	-	-
18	+	+++	-	-	-
50	-	+++	+	-	-
312	-	+	-	-	++
326	+	++++	-	-	-
331	+	+++	-	+	-
333	+	++++	-	-	-
335	+	+++	-	-	-

y VON; uno fue simultáneamente positivo con FA y DEN y otro suero mostró reactividad con VEE y DEN simultáneamente (Cuadro 1).

## DISCUSIÓN

Este trabajo es la primera aproximación seroepidemiológica que se hace en Colombia sobre el virus del oeste del Nilo (VON). Con la introducción en América del VON en 1999 y la infección de animales en Centroamérica y en algunas islas del Caribe<sup>1-8</sup>, es importante vigilar en Colombia la presencia de este virus para anticipar posibles brotes en nuestras poblaciones. Los anticuerpos en poblaciones rurales cercanas a grandes extensiones de agua donde llegan aves migratorias indicarían la actividad y circulación del VON en zonas de influencia como la costa atlántica. Si bien la mayoría de las infecciones en humanos por el VON son subclínicas, existe un amplio rango de síntomas que incluye fiebre, mialgia, dolor de cabeza, problemas gastrointestinales, brote hasta meningoencefalitis<sup>2</sup>. La sintomatología es muy similar a otras enfermedades infecciosas como dengue, malaria, leptospirosis, hantavirus, influenza, por eso es importante establecer la utilidad de ayudas diagnósticas comerciales disponibles en el mercado para garantizar un diagnóstico oportuno y eficaz y así tomar las medidas adecuadas.

Los *Flavivirus* contienen epítopes que ocasionan reacciones cruzadas y por tanto son un problema en el diagnóstico serológico de estas enfermedades. En ese sentido, usando IFA ocho de los sueros estudiados presentaron reacciones cruzadas con DEN, VON, VEJ y VEE demostrando que es posible que existan anticuerpos específicos contra esos virus o reacciones cruzadas entre ellos<sup>10-13</sup> (Cuadro 1). La muestra número 50, presentó

reacciones cruzadas entre DEN y FA. Es posible que esta persona haya sido vacunada contra FA, aunque en la amnesis no lo recordó; se conoce que los anticuerpos postvacunación contra FA persisten hasta tres décadas después de la aplicación<sup>13</sup>. Este trabajador del agro no estuvo en zona endémica. En general, estos trabajadores del campo y campesinos permanecen en su área de trabajo todo el año, la cual es circunscrita a su lugar de residencia. Con respecto a la serorreactividad del dengue de los ocho sueros, la costa Caribe es una zona endémica, por lo que la posibilidad de haber padecido dengue es muy alta (Cuadro 1).

Con respecto a los dos sueros de las personas serorreactivas al VEJ y al VEE, no se ha documentado la presencia de VEJ en Colombia, por lo que se considera como una reacción cruzada entre estos virus. Sin embargo, se desconoce por qué los otros sueros no presentaron serorreactividad ante el antígeno del VEJ. Quizás la débil positividad indicada con una cruz (+) demuestre una reacción inespecífica de la prueba. Con respecto a la serorreactividad del VEE, la zona donde se realizó la recolecta de los sueros no es endémica para este virus, por lo que se presume que es otra reacción cruzada entre estos *Flavivirus* o que exista probablemente una circulación próxima del VEE con el área de estudio (Cuadro 1). En relación con la serorreactividad de los seis sueros al VON con DEN y uno con VEJ por IFA, no se podría indicar circulación del VON en Colombia, por lo expuesto antes en relación con las reacciones cruzadas entre los *Flavivirus* y por la baja reactividad en la fluorescencia. Además, este trabajo tuvo como limitante que no se confirmó la seroreactividad de los casos por la prueba de neutralización en placa como recomienda el *Center for Disease Control* (CDC) y otros autores<sup>11,12,16,17</sup>.

Es importante resaltar, que las muestras de suero de este estudio se obtuvieron en el departamento de Sucre que se caracteriza por presentar numerosas ciénagas a lo largo del río San Jorge. Estos cuerpos de agua son el sitio de preferencia del arribo de aves migratorias, presumiblemente culpables de la introducción del VON en Norte América. Las ciénagas de la costa Caribe colombiana son lugares donde descansan estas aves; estos humedales son propicios para la presencia de vectores que transmiten el virus desde la aves infectadas a sanas, de las aves a los mosquitos y desde ahí hacia los humanos y animales sanos que se encuentran en los alrededores de estas amplias fuentes de agua. Aunque esto es una hipótesis interesante, falta por demostrar tal relación en Colombia.

Al respecto nuestro grupo ha comenzado la búsqueda de anticuerpos específicos contra VON en caballos, bovinos y otros animales domésticos por la técnica de neutralización en placa (PRNT). Se logró establecer una seroprevalencia de 12% en equinos de Córdoba y Sucre<sup>18</sup>.

La búsqueda de anticuerpos contra el VON en aves se debe realizar en aves indígenas de traspatio, porque es posible identificar los huéspedes intermediarios del virus. Encontrar anticuerpos en aves exóticas migratorias en esta zona costera dificulta su interpretación, porque no se conoce la historia y rutas exactas de su desplazamiento. Actualmente en el estado incipiente en que se encuentra la investigación del VON en Colombia, sería importante buscarlo en las aves comunes de la costa Atlántica que popularmente aquí se denominan «maría mulata» o «cocineras» (*Corvus brachyrhynchos*)<sup>14,15</sup> quienes son los más susceptibles de padecer la infección por VON y serían las centinelas precisas para observar la introducción del virus a Colombia, aunque se ha descrito en otras aves como gavilanes (*Accipitridae*) aves acuáticas y playeras de las familias de los correlimos (*Scolopacidae*), chorlos (*Charadriidae*), gaviotas y charranes (*Laridae*), patos (*Anatidae*), y algunas golondrinas (*Hirundinidae*)<sup>14,15</sup>. Los departamentos de Sucre y Córdoba presentan grupos densos de estas aves en las zonas húmedas.

La última opción es la búsqueda del VON en mosquitos por RT-PCR, aunque este procedimiento resulta costoso (10 dólares americanos por muestra), es la forma preliminar más eficaz para demostrar la presencia del virus en Colombia<sup>19</sup>. No obstante, existe un prueba preliminar para la búsqueda de antígenos denominada VecTest™ (Medical Analysis Systems, Camarillo CA, USA) que posee una buena sensibilidad entre 70% y 80%<sup>20</sup>. En estudios preliminares nuestro grupo ha analizado 3.000 mosquitos *Culex spp* por esta técnica y no se ha encontrado el VON (datos no publicados).

La prueba de ELISA usada en este estudio, con antígeno recombinante para establecer la presencia de anticuerpos contra el VON, aumenta posiblemente la sensibilidad, pero disminuye la especificidad en este estudio por la presencia de las reacciones cruzadas con el virus del dengue. Estos resultados contrastan con los de IFA, en los que se utilizan células infectadas con los arbovirus (VON, VEE, VEJ, FA y DEN) en la cual se observaron menos reacciones cruzadas aunque tampoco se tenían sueros conocidos de casos de infección por VON, para establecer su valor diagnóstico.

Los resultados de este estudio coinciden con otros

trabajos donde demuestran la existencia de reacciones cruzadas con este virus que pertenecen al mismo grupo antigénico, como el caso de VEJ y el VON; incluso, a pesar de pertenecer a serogrupos antigénicos diferentes como el caso de DEN y FA, también pueden presentar reacciones cruzadas<sup>10-13,16-18</sup>. Es cierto que estas reacciones cruzadas son frecuentes en la determinación de anticuerpos tipo IgG; sin embargo, son menores para establecer anticuerpos tipo IgM contra los *Flavivirus*<sup>11,13</sup>. No obstante, el uso de la IgG en estas encuestas seroepidemiológicas no se podría decir que posee un sesgo, porque para VON los anticuerpos permanecen hasta más de 3 meses elevados después del comienzo de la infección<sup>13</sup>. Sólo en los casos de encefalitis se recomienda la confirmación de los resultados con ensayos de neutralización en placa o usando IgM en líquido cefaloraquídeo<sup>11,17</sup>.

De otro lado, este trabajo no evaluó sueros de zonas andinas u otras regiones no endémicas para DEN, FA y VEE, con el objeto de establecer su utilidad en el área geográfica seleccionada. Es posible que las pruebas aquí evaluadas tengan algún valor diagnóstico para otras zonas, aunque la historia clínica debe ser muy cuidadosa sobre todo en los aspectos epidemiológicos y de medicina geográfica. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la prueba comercial de ELISA que usa un antígeno recombinante del virus del oeste del Nilo puede que no sea el medio de diagnóstico más adecuado contra el VON en Colombia, o por lo menos en las zonas en donde se presentan circulación de *Flavivirus* como dengue, fiebre amarilla o encefalitis equina. La prueba de IFA analizada en este trabajo, que emplea células infectadas con varios arbovirus (VON, VEE, VEJ, FA, DEN) al parecer resultaría eficiente para el diagnóstico del VON en Colombia, pero se deben realizar estudios complementarios con sueros humanos seropositivos y sueros de zonas no endémicas para evaluar la sensibilidad y especificidad de esta prueba en nuestras condiciones. También es importante tener en cuenta su alto costo y el alto impacto económico que tendría en los sistemas de salud o de vigilancia epidemiológica.

De otra parte, este trabajo aporta información sobre el posible problema de salud pública en los bancos de sangre de la región si el VON se incluye a los programas de tamización en estos centros. La tamización tendrá que hacerse una vez se demuestre el VON en el territorio. EE.UU. ya lo hace y en el informe del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados

Unidos (CDC)<sup>21</sup> se habían notificado 124 donadores con niveles virémicos de VON<sup>21</sup>. El riesgo en EE.UU. es mayor en los estados sureños como Arizona, California y Texas; sin embargo, 124 casos no es dramático para un país no situado en el trópico. En contraste, una vez el VON esté circulando en un ambiente tropical tan propicio como el del Caribe colombiano, podría producir un patrón endémico de infección en la población costeña. Bajo las condiciones geográficas de esta región, la amplificación de la transmisión del VON pasará sin problema al área urbana, donde existe una población susceptible y además una abundancia de mosquitos vectores y otros huéspedes aviares intermediarios que proveerían las condiciones para la introducción de una nueva etiología infecciosa.

En conclusión, el estudio demostró la complejidad del serodiagnóstico de los *Flavivirus* en las zonas endémicas como la del Caribe colombiano. Los resultados obtenidos en este trabajo, necesariamente implican que una vez se demuestre la llegada del VON a Colombia, habrá que realizar un diagnóstico serológico diferencial entre los diferentes *Flavivirus* circulantes para proporcionar un diagnóstico confiable al médico tratante. Desde ahora hay que abordar el problema del inminente arribo del VON a través de estudios centinelas en mosquitos, aves nativas, cuervos autóctonos (*Corvus brachyrhynchos*), equinos, bovinos y otros animales domésticos.

## AGRADECIMIENTOS

Al doctor Nelson Alvis por sus valiosos comentarios epidemiológicos; al doctor José Laguado (microbiólogo) por la revisión del manuscrito y sus aportes técnicos; a la Universidad de Córdoba y al Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, al CIUC y al Consejo Superior Universitario por su apoyo a esta investigación

## REFERENCIAS

1. Krauss H, Weber A, Appel M, Enders B, Isenberg H, Schiefer H, et al. *Zoonoses, infectious diseases transmissible from animals to humans*. 3<sup>rd</sup> ed. Washington DC: ASM Press; 2003. p. 2-171.
2. Sampathkumar P. West Nile virus: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and prevention. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 1137-1144.
3. Zeller H, Schuffenecker I. West Nile virus: An overview of its spread in Europe and mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 147-156.

4. Ministerio de Salud. Virus del Nilo occidental (NO), en las Américas. Alerta sobre su vigilancia en Colombia. *SIVIGILA* 2002 [en línea] [fecha de acceso enero 8 de 2004]. URL disponible en [http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2002/BOLE33\\_02.htm](http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2002/BOLE33_02.htm)
5. Lorono-Pino M, Blitvich BJ, Farfan-Ale JA, Puerto FI, Blanco JM, Marlenee NL, *et al.* Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatán state, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 857-859.
6. Dupuis A, Marra P, Kramer L. Serologic evidence of West Nile virus transmission, Jamaica, West Indies. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 860-863.
7. Komar O, Robbins MB, Klenk K, Blitvich BJ, Marlenee NL, Burkhalter KL, Gubler DJ, *et al.* West Nile virus transmission in resident birds, Dominican Republic. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1299-1302.
8. Quirin R, Salas M, Zientara S, Zeller H, Labie J, Murri S, *et al.* West Nile virus, Guadeloupe. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 706-708.
9. Hayes EB. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11: 1167-1173.
10. Prince H, Nixon M, Moore R, Hogrefe W. Utility of the focus technologies West Nile virus immunoglobulin M capture enzyme linked immunosorbent assay for testing CSF. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 12-15.
11. Koraka P, Zeller H, Niedrig M, Osterhaus A, Green J. Reactivity of serum samples from patients with *Flavivirus* infections measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes Infect* 2002; 4: 1209-1215.
12. Malan A, Martins T, Hill H, Litwin C. Evaluation of commercial West Nile virus immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme immunoassays show the value of continuous validation. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 727-733.
13. Tardei G, Ruta S, Chitu V, Rossi C, Tsai T, Cernescu C. Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile virus infection. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2232-2239.
14. Rosselli L. *Aves de Colombia y el virus del Nilo occidental. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.* [en línea] 2004 [fecha de acceso febrero 18 de 2005] URL disponible en: [http://www.ornitologiacolombiana.org/boletinespdf/west\\_nile.pdf](http://www.ornitologiacolombiana.org/boletinespdf/west_nile.pdf).
15. Komar N. West Nile virus: Epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res* 2004; 61: 185-233.
16. Martin D, Biggerstaff B, Allen B, Johnson A, Lanciotti R, Roehrig J. Use of immunoglobulin M cross-reactions in differential diagnosis of human Flaviviral encephalitis infections in the United States. *Clin Lab Immunol* 2002; 9: 544-549.
17. Martin D, Muth D, Brown T, Johnson A, Karabatsos N, Roehrig J. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1823-1826.
18. Máttar S, Edwards E, Laguado J, González M, Alvarez J, Komar N. West Nile virus antibodies in Colombian horses. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1497-1498.
19. Lanciotti R, Kerst A, Nasci R, Godsey M, Mitchell C, Savege H, *et al.* 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* 2000; 38: 4066-4071.
20. Stone W, Okoniewski J, Therrien J, Kramer L, Kauffman E, Eidson M. VecTest as a diagnostic and surveillance tool for west Nile virus in dead birds. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2175-2181.
21. Centers for Disease Control and Prevention. *West Nile virus viremic blood donor.* Activity in the United States, Statistics, Surveillance, and Control. [en línea] 2004 [fecha de acceso Septiembre 14 de 2004] URL disponible en: [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control04Maps\\_Viremicpdf.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control04Maps_Viremicpdf.htm)