

Evaluación de vectores para el Virus del Oeste del Nilo en Venezuela, utilizando VecTest™ para el diagnóstico rápido de mosquitos infectados.

Glenda Velásquez¹, Flor Herrera¹, Nicholas Komar², Humberto Montañéz³, Francisco Alfonso³, José Rivero¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua, Universidad de Carabobo, Venezuela. glenticks@hotmail.com, flormbq@gmail.com, jonnrive@yahoo.es.

²Center for Disease Control and Prevention. EEUU Nicholas Komar. nck6@cdc.gov

³Coordinación de Zoonosis. Dirección Salud Ambiental. Ministerio de Salud. Venezuela

Resumen

VELÁSQUEZ G, HERRERA F, KOMAR N, MONTAÑÉZ H, ALFONSO F, RIVERO J. 2008. Evaluación de vectores para el Virus del Oeste del Nilo en Venezuela, utilizando VecTest™ para el diagnóstico rápido de mosquitos infectados. ENTOMOTROPICA 23(2):167-172.

Entre junio de 2006 y junio de 2007, se colectaron mosquitos en busca de hospederos, usando trampas de luz cebadas con CO₂ y se analizaron en grupos (pools) para demostrar la presencia de antígeno del Virus del Oeste del Nilo (VON) mediante la prueba de VecTest™ (ensayo rápido de captura de antígeno en formato indicador). Se tomaron muestras de mosquitos en el oriente y occidente de Venezuela, en ambos casos en localidades urbanas y rurales. Los antígenos de VON no fueron identificados entre los 11.684 mosquitos capturados. La especie más predominante resultó ser *Culex (Cu.) mollis* (Dyar & Knab, 1906) 70,4 % y *Aedes taeniorynchus* (Wiedemann, 1821) 15,6 % en el Municipio Páez en el Estado Zulia, mientras que en el estado Sucre, *Coquilletidia venezuelensis*, (Theobald, 1912) fue el mosquito capturado con mayor frecuencia (51%). El vector de VON en Venezuela permanece sin identificar. Investigaciones entomológicas adicionales, se deben realizar donde haya sido demostrado la existencia de infecciones en vertebrados.

Palabras clave adicionales: vigilancia entomológica, VON, Venezuela.

Abstract

VELÁSQUEZ G, HERRERA F, KOMAR N, MONTAÑÉZ H, FRANCISCO A, RIVERO J. 2008. West Nile virus vector assessment in Venezuela, utilizing VecTest™ for rapid detection of infected mosquitoes. ENTOMOTROPICA 23(2):167-172.

Between June, 2006 and June, 2007, host-seeking mosquitoes were collected using CO₂-baited light traps and tested in pools for the presence of WNV antigen using the VecTest™ rapid dipstick antigen capture assay. Mosquitoes were sampled in eastern and western Venezuela, in both urban and rural localities. WNV antigens were not detected among 11,684 mosquitoes. The most predominant species were *Culex (Cu.) mollis*, (Theobald,1903) (70.4 %) and *Aedes taeniorynchus* (Wiedemann ,1821) (15.6 %) in the Municipality Páez in Zulia State, whereas in Sucre State, *Coquilletidia venezuelensis*, (Theobald,1903) (51%) was the most frequently captured mosquito. The vector of WNV in Venezuela remains unidentified. Additional entomological investigations should be carried out in the vicinity of documented vertebrate infections.

Additional key words: Entomological surveillance, WNV, Venezuela.

Introducción

Estudios serológicos realizados en équidos y aves residentes, detectaron la presencia de anticuerpos específicos contra el Virus del Oeste del Nilo (VON) (género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*; WNV) en ambas clases de vertebrados en el

territorio Venezolano en 2005, lo que indica la probable introducción de este virus en el año 2004 o antes (Bosch et al. 2007). Siendo un virus transmitido por mosquitos y capaz de fomentar brotes de encefalitis en caballos y humanos, urge

estudiar la ecología local del virus en Venezuela. Los mosquitos del género *Culex* (subgénero *Culex*), son vectores competentes importantes en varios países, por lo que, muy probablemente, también lo sean en Venezuela (Hayes 1989). Este trabajo pretende conocer los posibles vectores de VON en Venezuela.

El país tiene las características geográficas, climáticas y socioculturales, y un gran número de vectores potenciales para la transmisión de VON. Ya se ha reportado la presencia de anticuerpos en aves migratorias y residentes en Venezuela aunque no han sido identificados casos en humanos y no se conocen publicaciones relacionadas con vectores en el país Bosch y col. (2007). Se han realizado estudios seroepidemiológicos en 33 localidades de la República, utilizando muestras de aves y équidos, para la detección de anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) contra antígenos de VON por ELISA y confirmados por pruebas de neutralización en placas (PRNT) según Bosch y col. (2007).

Para el desarrollo de esta investigación se escogieron los estados Zulia y Sucre que además de presentar aves (residentes y migratorias) con anticuerpos contra VON, forman parte de las rutas de aves migratorias y cuentan con las condiciones climatológicas y ecológicas adecuadas para permitir la transmisión activa de la enfermedad.

El VON puede ser diagnosticado por RT-PCR ya que esta técnica es específica y rápida pero resulta muy costosa (10 dólares americanos por muestra). Existe una prueba alternativa para la búsqueda de antígenos para VON denominada VecTest™ (Medical Analysis Systems, Camarillo CA, USA) que posee una buena sensibilidad entre 70% y 80% (Stone et al., 2004).

El Vectest es un ensayo que detecta el antígeno de VON, mediante el uso de anticuerpos monoclonales en contra del virus y del grupo de *Flavivirus* que permite detectar la presencia o ausencia del antígeno viral en mosquitos. Esta prueba es de fácil ejecución, cuyos resultados pueden ser expresados de manera rápida, no requiere de equipamiento especial y los reactivos pueden ser conservados a temperatura ambiente (Bentfield y col., 2004). Se ha determinado que la sensibilidad de la técnica es del 65% cuando se le comparó con otra metodología

de diagnóstico rápido (RAMP), (Burkhalter et al., 2006, Stone et al., 2004). Así mismo, Nasci et al. (2002) en un estudio donde analizaron 10.866 mosquitos (801 pools), reportaron casos positivos con una sensibilidad del 67%, en comparación con el Ensayo en placa de Células Vero y la técnica de RT PCR. Esto significa que la prueba tiene una sensibilidad adecuada para diagnosticar de forma rápida la presencia del virus en los vectores.

El objetivo de éste estudio fue determinar la presencia de antígenos de VON en ejemplares capturados utilizando la técnica de VecTest™, en dos sitios de reposo de aves, en dos estados del país. Este estudio podría determinar la existencia de antígenos en vectores e identificar las posibles especies vectoras, así como, variables ecológicas que podrían convertirse en indicadores de la presencia del VON en los estados venezolanos en los que se llevo a cabo la investigación.

Materiales y Métodos

Entre junio de 2006 y junio de 2007 se hizo un estudio de tipo transversal, cuya muestra quedó integrada por 2 estados, 2 municipios en localidades urbanas y rurales, del oriente y occidente del país. La unidad de muestreo la constituyeron las viviendas y los sectores seleccionados donde se colocaron las trampas para la colecta de los ejemplares.

El muestreo entomológico se efectuó en los estados Zulia y Sucre. En el primero se seleccionó el sector situado entre los paralelos (lat 11°02'59" N - long 71°52'0" W) que incluye parte del Municipio Páez, en la localidad de Sinamaica, cerca de la población de San Rafael de Moján, al norte del estado Zulia, a unos 145 Km de la ciudad de Maracaibo, occidente de Venezuela. Está emplazada a 10 m de altitud al norte del río Limón, tocando a la Laguna de Sinamaica, cuyo clima, se corresponde al bosque húmedo tropical que circunda el Lago de Maracaibo (Walder y Suárez, 1976). Se comunica por carretera con Maracaibo y Paraguaipoa. Está separada del Golfo de Venezuela por un litoral de médanos.

El otro sector del estudio seleccionado fue la Laguna de Sinamaica, a una distancia de 10 Km de la localidad de Sinamaica, vía Puerto Cuervito. La

altitud de ambas zonas de estudio es de 14 msnm, presentan una precipitación anual de 581mm, con un periodo de lluvias comprendido entre los meses de abril hasta noviembre, siendo en este sentido el mes de julio un periodo de menor lluviosidad, para volver a incrementarse en agosto, reportándose el mes de octubre como el más lluvioso (114 mm) con una media anual de 48,41 mm. La temperatura promedio registrada durante el estudio fue de 28,67 °C, (máxima 31,2 °C y mínima 27,2 °C) con un promedio de humedad relativa alta de 68% durante todos los meses del año, detectándose, en esta investigación una mínima de 59 % y una máxima de 78 %. La vegetación dominante consiste en bosques de manglar principalmente mangle negro (*Avicennia germinans*), en las márgenes del área peri-urbana y mangle rojo (*Rhizophora mangle*), en la rivera de la laguna, así como, de grandes eneaes.

En el estado Sucre, se seleccionaron tres sectores de la Laguna de los Patos, parroquia Altagracia, Municipio Sucre, ubicado en el noreste del Mar Caribe. El sitio de estudio de la laguna se ubica entre los paralelos (lat 10°25.08' 80" N - long 64°12.29'.56"W), la altitud de la zona de estudio fue de 3 msnm. En este sector de la laguna disminuye el nivel del agua cuando se inicia el verano, no obstante, en la laguna se observa una vegetación semiárida con precipitación media anual de 104 mm y dos estaciones, una lluviosa que comienza en mayo y termina en noviembre y una estación seca, que se inicia en diciembre para finalizar en el mes de abril, cuya temperatura media anual, fue de 28,8 °C, con una humedad relativa promedio de 65%. La vegetación natural esta compuesta principalmente por bosque de humedal con una vegetación presente y dominante de mangle rojo (*Rhizophora mangle*) de altura a escasos metros, bosque adyacente al pie del cerro, espinoso, muy seco, tropical, cardones, tunas, cujies. Existen aves silvestres del grupo de los córvidos y paseriformes, así como roedores entre los que se incluyen ratones y conejos. También se crían animales domésticos (perros, gatos y aves de corral), similares condiciones se observaron en los sitios de colecta investigados en el estado Zulia.

La recolección diaria de mosquitos se inicio a las 18:00 horas y finalizó a las 06:00 horas del siguiente

día, en los referidos estados, con la diferencia que en el estado Zulia los muestreos fueron realizados durante tres días consecutivos, mientras que en el estado Sucre, se efectuaron en dos días. Las colectas se efectuaron empleando como método de captura trampas CDC, usando como atrayente dióxido de carbono, dichas colectas fueron realizadas, tanto peri, como extradomésticas en La laguna de los Patos, mientras que, en los sectores de Sinamaica, se realizaron intra, peri y extradomésticas. En el momento de colocación y retiro de las trampas, se hicieron las anotaciones correspondientes a temperatura, humedad relativa y precipitación y luego las trampas se retiraron del lugar. Así mismo, los ejemplares capturados vivos fueron colectados con un capturador manual y conservados en nitrógeno líquido y los ejemplares muertos, fueron trasvasados directamente a envases plásticos y preservados también en nitrógeno líquido, para que ambos grupos pudieran ser identificados posteriormente

Los especímenes fueron identificados, en los laboratorios de la Demarcación Experimental de Encefalitis Equina y otras arbovirosis, ubicada en Sinamaica Municipio Páez, Guajira venezolana, estado Zulia (Atilio Exeario Márquez) y en la Demarcación de Santa Fe (Jonás Rodríguez) mediante la claves de Lane (1953) y Bram (1967). Posteriormente, los mosquitos se agruparon, cuando fue posible, en número de 50 por especie, seguidamente fueron macerados con la ayuda de un macerador mecánico (Cordless motor) reemplazando, por cada pool de mosquitos de la misma especie, un pistón (pellets pestle blue) y adicionando el tampón provisto en el Kit (Vec-TestM, West Nile Antigen Assay) (gentilmente donado por CDC Fort Collins, EEUU). Seguidamente, el extracto se centrifugó y se tomó el sobrenadante que se trasvasó a viales plásticos, debidamente identificados, donde se determinó la presencia o no de infección viral en cada una de las especies de mosquitos colectadas, mediante el uso de tiras con formato indicador.

Resultados y Discusión

Se identificó un total de 11.684 mosquitos, pertenecientes a seis géneros con nueve y trece especies de mosquitos en los estados Zulia y Sucre, respectivamente.

Culex (Cu) mollis (Dyar & Knal, 1906) y *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821), dominaron las colectas en el estado Zulia (Cuadro N° 1), mientras, *Coquilletidia venezuelensis* (Theobald, 1912) y *Mansonia titillans* (Walker, 1948) fueron las especies más, frecuentemente, encontradas en las de el estado Sucre (Cuadro N° 2). Ningún pool (n=254) resultó positivo para la detección de antígeno de VON, aunque fueron capturados mosquitos *Culex* (en ambos estados), género que ha sido incriminado como vector en la transmisión del VON (Komar, 2003). Se colectaron *Culex bidens* (Dyar, 1922) y *Culex mollis* (Dyar & Knal, 1906), siendo el primero, más frecuente en los sectores seleccionados del estado Sucre y el segundo en los del estado Zulia. Al respecto, Bradford y col. (2005) señalaron en un estudio similar con VectestM, realizado en un Condado de Texas (Lubbock County), que la especie predominante infectada con VON fue *Culex tarsalis* (Coquillett, 1896). Así mismo, con el empleo de esta técnica, Nasci y col. (2002) han encontrado pools de mosquitos positivos de las especies *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) y *Culex salinarius* (Coquillett, 1904).

Es importante destacar que, en ambos muestreos efectuados en la estación lluviosa en nuestro país, en el mismo mes, con similares tipo de vegetación predominante en las márgenes de ambas lagunas, se encontraron diferencias significativas en cuanto a especies predominantes de vectores y variables ambientales. Al referirse a la vegetación, Jaramillo et al. (2005) consideran que la transmisión del VON se realiza, preferentemente, en áreas que comprenden zonas de ciénagas con un ecosistema tropical de valle, predominando un área de bosque seco tropical. Nuestras áreas no coinciden con estas características, por lo que se podría considerar estudiar otras para futuras investigaciones. En cuanto a la época del año estudiada, se ha reportado que los meses de mayo y octubre son los meses con mayor transmisión de la enfermedad y, aunque

en nuestro estudio los incluimos, no detectamos infección en los mosquitos (Huhn y col., 2003).

Otro aspecto que vale la pena mencionar es la altitud del lugar, Jupp (2001) considera que la posibilidad de transmisión de VON a especies del género *Culex* esta relacionado con la presencia del vector en costas de menor altitud. En nuestro estudio las costas del estado Sucre presentan esta característica, pero no se evidenció una mayor densidad de mosquitos del género *Culex*, en el muestreo efectuado. Por el contrario, hubo mayor densidad de este mosquito en el estado Zulia, a pesar de tener costa con una mayor altitud.

En relación a la temperatura cabe destacar, que si bien en el estudio los rangos oscilan entre (27.2-31.2°C), pudiéramos pensar, en comparación a lo expresado por Dohm et al. (2001) acerca de la mayor habilidad de *Culex pipiens* para transmitir VON a 30°C en condiciones de laboratorio, que las márgenes de la Laguna de Sinamaica en el estado Zulia, podrían ofrecer la temperatura propicia (cerca a 30°C) para el mantenimiento de la infección en los mosquitos.

Ahora bien, si tomamos en cuenta lo observado por Jupp (2001), en relación al aislamiento del virus en el *Culex univittatus* (Theobald, 1901) en áreas donde el clima tiene un periodo seco muy caluroso, seguido de lluvias inusuales, se podría considerar que el estado Zulia, por poseer un clima similar, sería la jurisdicción de mayor riesgo ya que allí se encontró también el género *Culex*, aunque diferente especie.

El resultado negativo del diagnóstico realizado a los ejemplares muestreados utilizando el VecTest™, concuerda con estudios realizados, utilizando la misma técnica, en Colombia, en donde no se encontraron pools positivos en 99 especies de mosquitos diferentes capturados desde octubre de 2004 hasta junio de 2005 (Jaramillo et al., 2005).

Otro aspecto que Lampman et al., (2006) consideraron es el hecho de que la sensibilidad de la prueba pareciera ser mayor cuando existe una tasa alta de infección en los mosquitos. Ellos practicaron la prueba a mosquitos colectados en el año 2002 obteniendo una sensibilidad de un 57% en comparación con la técnica de RT-PCR. Colectas posteriores en la misma área en

Cuadro 1. Especies de mosquitos recolectadas, estado Zulia.

Especies	CDC 1		CDC 2		CDC 3		CDC 4		CDC 5		TOTAL
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
<i>Mansonia titillans</i>	1	3.84			4	15.4	18	69.2	3	11.54	26
<i>Coquilletidia venezuelensis</i>					13	100					13
<i>Culex (Cu) mollis</i>	385	30.0	3	0.23	805	62.79	43	3.35	46	3.58	1282
<i>Culex (Cu) fairchildi</i>	12	52.17			11	47.82					23
<i>Culex (Melanoconium) sp</i>					67	97.1	2	2.89			69
<i>Aedes taeniorynchus</i>	196	68.77	22	7.71	55	19.29	12	4.21			285
<i>Anopheles aquasalis</i>	95	79.83	14	11.76	4	3.36	3	2.52	3	2.52	119
<i>Uranotaenia lowis</i>					4	100					4
<i>Uranotaenia typhilosomata</i>					1	100					1
Total	689		39		964		78		52		1822

Cuadro 2. Especies de mosquitos recolectadas, estado Sucre.

Especies	CDC 1		CDC 2		CDC 3		TOTAL
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
<i>Deinoceritis sp.</i>	99	95.1	5	4.80			104
<i>Deinoceritis atlanticus</i>	358	100					358
<i>Mansonia titillans</i>	170	4.29	3700	93.5	87	2.19	3957
<i>Mansonia nigricans</i>	8	47.0	9	52.9			17
<i>Coq. venezuelensis</i>	104	3.06	4505	89.4	430	8.53	5039
<i>Culex (Cu) mollis</i>	17	100					17
<i>Culex (Cu) bidens</i>	18		186		127		331
<i>Aedes aegypti</i>			1	100			1
<i>Aedes taeniorynchus</i>	12		10		2		24
<i>Aedes scapularis</i>			9	100			9
<i>Ixodes scapularis</i>	1	100					1
<i>Anopheles aquasalis</i>			2	100			2
<i>Uranotaenia lowis</i>			1	100	1		2
Total	787		8428		647		9862

los años 2003 y 2004, cuando la tasa de infección en los mosquitos era menor, arrojaron un 40% de positividad. Esto podría también ser un factor importante en nuestros resultados, ya que el número de ejemplares colectados del género *Culex*

fué < 1400 en el Zulia y <400 en Sucre. En este último estado, los ejemplares colectados en mayor abundancia fueron *Coq. venezuelensis* (5.039) y *Mansonia titillans* (3.957). Para estas dos especies de mosquitos podríamos pensar que, si ellas fuesen

potencialmente vectoras del virus, su tasa de transmisión es baja en las condiciones en las cuales se hizo el estudio. Habría que emprender trabajos de campo donde se colectaran mayor número de ejemplares.

Agradecimientos

El grupo de trabajo quiere agradecer la colaboración prestada por la Ingeniera Cinda Martínez (Adjunta a la Coordinación de Vigilancia de Focos Enzoóticos y Control de Roedores de la Dirección de Control de Vectores de la Dirección de Salud Ambiental del Ministerio del Poder Popular para la Salud) en su apoyo del trabajo de campo; a todo el personal de las Demarcaciones ubicadas en Sinamaica (estado Zulia) y Santa Fe (estado Sucre), por facilitarnos las labores de investigación y a la memoria del Dr. Jorge Platz por su respaldo para emprender este estudio. Este trabajo fue financiado, parcialmente, por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, MPP Ciencia y Tecnología Venezuela.

Referencias

- BENTFIELD D, ELLNOR D, SCHROEDER D. 2004. West Nile Virus mosquito surveillance program Clark, Floyd and Harrison counties, Indiana 2003. Biology Department. Indiana University.
- BOSCH I, HERRERA F, NAVARRO J, LENTINO M, DUPUIS, A; MAFFEI, J; JONES, M; FERNÁNDEZ, E; PÉREZ, N; PÉREZ-EMÁN, J; GUIMARÃES, A; BARRERA, R; VALERO, N; RUIZ, J; VELÁSQUEZ, G; MARTINEZ, J; COMACH, G; KOMAR, N; SPIELMAN, A Y KRAMER, L. 2007. West Nile virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis.* 13.
- BRADFORD C, NASCARELLA M, BURNS T, MONTFORD J, MARSLAND E, PEPPER C, PRESLEY S. 2005. First report of West Nile virus in mosquitoes from Lubbock County, Texas. *J Am Mosq Control Assoc.* 21:102-105.
- BRAM R. 1967. Classification of *Culex* subgenus *Culex* in the New World (Diptera: Culicidae). 120: 1-122.
- BURKHALTER K, LINDSAY R, ANDERSON R, DIBERNARDO A, FONG W, NASCI R. 2006. Evaluation of commercial assays for detecting West Nile virus antigen. *J Am Mosq Control Assoc.* 22: 64-69.
- DOHM D, O'GUINN M, TURELL M. 2001. Effect of Environmental Temperature on the Ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to Transmit West Nile Virus. *Journal of Medical Entomology.* 39:221-225.
- HAYES E, KOMAR N, NASCI R, MONTGOMERY S, O' LEARY D, CAMPBELL G. 2005. Epidemiology and Transmission dynamics of West Nile Virus Disease. *Emerg Infect Dis.* 7:611-614.
- HUHN G, SEJVAR J, MONTGOMERY S, DWORKIN M. 2003. West Nile Virus in the United States: an update on an emerging infectious disease. *Am Fam Physician* 68: 653-660.
- JARAMILLO M, PEÑA J, BERROCAL L, MATTAR S, GONZÁLEZ M, KOMAR N. 2005. Vigilancia centinela para el virus del Oeste del Nilo en Culicidos y aves domésticas en el departamento de Córdoba. *MVZ- Córdoba* 10:633-638.
- JUPP P. 2001. The Ecology of West Nile Virus in South Africa and the Occurrence of Outbreaks in Humans *Annals of the New York Academy of Sciences.* 951: 143-152.
- KOMAR N. 2003. West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res* 61: 185-234.
- LAMPMAN R, KRASAVIN N, SZYSKA M, NOVAK R. 2006. A comparison of two West Nile virus detection assays (TaqMan reverse transcriptase polymerase chain reaction and VecTest antigen assay) during three consecutive outbreaks in northern Illinois. *J Am Mosq Control Assoc.* 22:76-86.
- LANE J. 1953. Neotropical Culicidae. Sao Paulo, Brazil, University of Sao Paulo, 1112pp.
- NASCI R, GOTTFRIED K, BURKHALTER K, KULASEKERA V, LAMBERT A, LANCIOTTI R, HUNT A, RYAN J. 2002. Comparison of vero cell plaque assay, TaqMan reverse transcriptase polymerase chain reaction RNA assay, and VecTest antigen assay for detection of West Nile virus in field-collected mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 18: 294-300.
- STONE W, OKONIEWSKI J, THERRIEN J, KRAMER L, KAUFFMAN E, EIDSON M. 2004. VecTest as a diagnostic and surveillance tool for West Nile virus in dead birds. *Emerg Infect Dis* 10:2175-2181.
- WALDER R, SUÁREZ O. 1976. Studies of arbovirus in southwestern Venezuela; Isolations of Venezuelan and eastern equine encephalitis viruses from sentinel hamsters in the Catatumbo region. *Int J Epidemiology.* 5:375-384.