

**Universidad Nacional**  
**Facultad de Ciencias de la Salud**  
**Escuela de Medicina Veterinaria**

**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 enfermedad  
neurológica en equinos en Costa Rica**

**Modalidad Tesis**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico  
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

**Luis Mario Romero Vega**

**Campus Pbro. Benjamín Núñez**

**2015**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR**

---

**Dra. Nancy Astorga Miranda**

**Delegada por el Decanato de la Facultad de Ciencias de la Salud**

---

**M.Sc. Laura Bouza Mora**

**Subdirectora de la Escuela de Medicina Veterinaria**

---

**Dr. Carlos Jiménez Sánchez**

**Tutor**

---

**Dr. Mario Baldi**

**Lector**

---



**Dra. Sabine Hutter**

**Lectora**

**3 de noviembre de 2015**

## **DEDICATORIA**

A Mami y Papi, simplemente gracias por hacerme lo que soy.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Gracias a mis papás por darme el apoyo necesario para culminar este trabajo de graduación.

Gracias a mi hermana por ser una fuente de inspiración y modelo para seguir.

Gracias al Dr. Carlos Jiménez por contagiarme de su pasión por los virus y servirme de ejemplo tanto académica como personalmente.

A la Dra. Martha Piche y las técnicas Lourdes Delgado y Rocío Cortés por la guía y apoyo brindado en el Laboratorio de Virología.

Gracias a los doctores Alfaro Alarcón, Baldi Salas, Luna Tortós y Murillo Herrera por ser más que profesores y enseñarme otros valores fuera del programa de estudios.

Gracias a los biólogos Paulo Araya y Víctor Salas, así como a las compañeras Nathalie Bolaños, Sofía Herra y Carolina Jiménez por el apoyo en el trabajo de campo. A Sofía, especiales gracias.

Gracias al Sr. Adrián “Zaza” Zamora por ir más allá de sus obligaciones y ser de suma ayuda en las giras de campo.

Gracias a Lau, por ser mi compañera de aventuras y vicisitudes; y mi principal fuente de apoyo.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR.....</b>	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Alfavirus.....	1
1.1.2. Flavivirus.....	2
1.1.3. Vectores.....	3
<b>1.2. Justificación.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Objetivos.....</b>	<b>8</b>
1.3.1. Objetivo General.....	8
1.3.2. Objetivos específicos.....	8
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Número de muestra.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Puntos de Muestreo.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3. Muestreo en Campo.....</b>	<b>10</b>
2.3.1. Captura de especímenes.....	10
2.3.2. Toma de muestras.....	11
2.3.3. Almacenamiento de muestras.....	12
<b>2.4. Análisis de Laboratorio.....</b>	<b>12</b>
2.4.1. Aislamiento Viral.....	12
2.4.1.1. Crecimiento de Células.....	12
2.4.1.2. Inoculación de células.....	13
2.4.1.2.1. Preparación del Inóculo.....	13

2.4.1.2.2.	Inoculación.....	13
2.4.1.2.3.	Pasajes.....	13
2.4.2.	Análisis Moleculares.....	14
2.4.2.1.	Extracción de ARN.....	14
2.4.2.2.	Síntesis de cDNA.....	14
2.4.2.3.	Amplificación de ADN Viral.....	15
2.4.2.4.	Secuenciación de ADN.....	17
2.4.2.5.	Análisis filogenético.....	19
3.	RESULTADOS.....	20
3.1.	Especies.....	20
3.2.	Aislamientos.....	21
3.3.	Secuenciación.....	21
3.3.1.	West Nile Virus.....	21
3.3.2.	Encefalitis Equina del Este.....	24
3.3.3.	Encefalitis Equina Venezolana.....	26
4.	DISCUSIÓN.....	27
4.1.	Arbovirosis en Costa Rica.....	27
4.1.1.	West Nile Virus.....	29
4.1.2.	Alfavirus.....	30
4.2.	Filogenia.....	31
4.3.	Hábitos ecológicos.....	33
5.	CONCLUSIONES.....	36
6.	RECOMENDACIONES.....	37
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	38

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Casuística por agente y zona diagnosticada en el Laboratorio de Virología.....	6
<b>Cuadro 2.</b> Puntos de muestreo. ....	10
<b>Cuadro 3.</b> Secuencias de primers utilizados en los distintos PCRs.....	16
<b>Cuadro 4.</b> Regiones amplificadas por PCR.....	19
<b>Cuadro 5.</b> Especies capturadas.....	20
<b>Cuadro 6.</b> Aislamientos virales por especie. ....	21

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Protocolo de retrotranscripción (cDNA) de ARN viral.....	15
<b>Figura 2.</b> Ciclo de amplificación para BigDye® Terminator v3.1.....	18
<b>Figura 3.</b> Análisis filogenético de los aislamientos de WNV.....	23
<b>Figura 4.</b> Análisis filogenético de los aislamientos de EEE.....	25
<b>Figura 5.</b> Análisis filogenético de los aislamientos de EEV.....	27

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
cDNA:	ADN complementario
IgG:	Inmunoglobulina G
IgM:	Inmunoglobulina M
EEE:	Encefalitis Equina del Este
EEO:	Encefalitis Equina del Oeste
EEV:	Encefalitis Equina Venezolana
PCR:	Cadena en reacción de la polimerasa
SFB:	Suero Fetal Bovino
TBE:	TrisBASE-Acido Borico-EDTA
WNV:	West Nile Virus

## RESUMEN

Los Alfavirus y Flavivirus pueden causar enfermedad febril y, en algunos casos, enfermedad neurológica, tanto en seres humanos como en animales. Los virus Encefalitis Equina del Este y Encefalitis Equina Venezolana, Encefalitis Equina del Oeste y West Nile pueden utilizar aves silvestres como amplificadores en su ciclo epidemiológico. En Costa Rica existe un vacío epidemiológico en cuanto al conocimiento de los subtipos virales de Alfa- y Flavivirus circulantes y las aves involucradas en el ciclo.

Para determinar la presencia y caracterizar estos agentes, se muestrearon aves silvestres en zonas con reporte confirmado de casos clínicos de encefalitis en equinos. Se establecieron seis sitios de muestreo, caracterizados por ser zonas límites entre bosques y zonas agropecuarias.

Mediante el uso redes de niebla, colocadas en zonas de paso y bosques de galería, se recolectaron 100 individuos de 52 especies diferentes, principalmente Passeriformes. Muestras clínicas, colectadas de las aves capturadas, fueron inoculadas en cultivos de la línea celular C6/36, realizando un total de dos pasajes. Posteriormente, cada cultivo fue analizado mediante PCR para WNV, EEE, EEV, y se obtuvieron los siguientes resultados: VON (1/100), EEE (3/100), EEV (3/100), EEO (0/100). No se realizó más de un aislamiento en una misma especie, sugiriendo que la población que mantiene el virus en el ciclo silvestre es muy heterogénea. En contraste, los subtipos virales para cada agente, no difieren entre ellos y coinciden filogenéticamente con aislamientos realizados en la región mesoamericana.

## ABSTRACT

The Alphavirus and Flavivirus can cause febrile illness and neurologic symptoms in both: humans and domestic animals. The Eastern Equine Encephalitis Virus (EEE), Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEE), Western Equine Encephalitis Virus (WEE) and West Nile Virus (WNV); may use wild birds as amplifiers in their epidemiological cycle. In Costa Rica, there is a lack of knowledge about which viral subtypes of Alphavirus and Flavivirus are circulating among the country, and which avian species are involve in these cycles. To establish the presence and describe these viruses, as well as which species are involve in their cycles, we captured wild birds in areas with positive history of equine cases with neurologic symptoms due to these viruses. We select six sampling points based on their agricultural-forest landscape. Using mist nets, we collected 100 birds of 52 different species, being Passeriforms the majority of them. Samples from these birds were used to inoculate cell cultures from the C6/36 cell line, making a total of two passages. To every cell culture flask, we did a PCR to determine the presence of WNV, EEE, VEE and WEE viruses, therefore confirming the isolation of a virus. The results were the following: WNV (1/100), EEE (3/100), VEE (3/100), WEE (0/100). There was no isolation of any virus in the same species of bird, suggesting the wild population that serves as amplifier is very heterogenic. On the other hand, the viral subtypes did not differ among them and they match in terms of phylogeny other isolates from the Mesoamerican region.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

La mayoría de arbovirus se mantienen en un ciclo selvático a través de artrópodos y vertebrados reservorios: aves, roedores y primates no humanos (Hollidge et al., 2010). El término arbovirus es un acrónimo proveniente del inglés “Arthropod-Borne Viruses”, el cual agrupa todos los virus transmitidos por artrópodos, independientemente de su clasificación taxonómica (Foster y Walker, 2002).

Los arbovirus mantienen normalmente una baja incidencia, manteniéndose principalmente en un ciclo vector-reservorio, pero cuando las condiciones ambientales son idóneas pueden ocurrir brotes explosivos (Weidong et al., 2008). La aparición local de estos virus está regulada por la cantidad de vectores y reservorios, por lo tanto, es dependiente de cambios climáticos y ecológicos (Knipe y Howley, 2007). Tanto los virus pertenecientes a los géneros *Alfavirus* como *Flavivirus* son considerados arbovirus.

#### 1.1.1. *Alfavirus*

El género *Alfavirus* pertenece a la familia *Togaviridae*. En este género se incluye a los virus de Encefalitis Equina del Este (EEE), Encefalitis Equina del Oeste (EEO) y Encefalitis Equina Venezolana (EEV) (Gould et al., 2010; MacLachlan y Dubovi, 2011). Son virus envueltos, con un genoma de una única hebra de ARN positivo, su cápside posee una simetría icosaédrica y miden aproximadamente 60-70 nm (MacLachlan y Dubovi, 2011).

Los virus de las encefalitis equinas no causan enfermedad en las aves silvestres, pero causan enfermedad febril y encefalitis en humanos y caballos (Forshey et al., 2010; MacLachlan y Stott, 2004). Los *Alfavirus* pueden utilizar roedores y/o aves de la familia de los passeriformes

como reservorios efectivos (Forrester et al., 2008; Morrison et al., 2012 Arrigo et al. 2010b; Barker et al., 2010; Adams et al., 2012; Vander Kelen et al., 2012; Estep et al., 2013).

Existen cuatro linajes de EEE: I, II, III y IV (Braut et al., 1999). El linaje I comprende aislamientos realizados en Norteamérica y el Caribe, mientras que los linajes II, III y IV comprenden aislamientos realizados en Centroamérica y Suramérica. El linaje I difiere del II-IV tanto por sus patrones evolutivos (Arrigo et al., 2010a) como por su virulencia (Aguilar et al., 2007). Debido a esta diferencia, entre los linajes de Norteamérica, Centroamérica y Suramérica, también se propone la idea de separar ambos virus y tratarlos como un complejo viral.

El virus de EEV pertenece al Complejo Viral de la Encefalitis Equina Venezolana. Este complejo abarca siete especies virales diferentes, el cual incluye virus avirulentos para humanos y equinos, que mantienen ciclos selváticos únicamente (Weaver et al., 2004). Existen cuatro subtipos del virus de EEV de los cuales IAB y IC son los principales causantes de epizootias, mientras que los subtipos IE e ID suelen ser avirulentos; no obstante, se han reportado brotes causados por IE y aislamientos en personas febriles del ID (Oberste et al., 1999; González et al., 2003; Weaver et al., 2004).

Finalmente, el Complejo Viral de la Encefalitis Equina del Oeste comprende varias especies virales en las que sobresalen el virus de EEO, Highland J Virus y Sindbis Virus. No existen subtipos de EEO (Weaver et al., 1997).

### **1.1.2. Flavivirus**

El género *Flavivirus* pertenece a la familia *Flaviviridae*, incluye varios virus tanto de importancia veterinaria como humana (MacLachlan y Stott, 2004; MacLachlan y Dubovi, 2011; Gale y Jonhson, 2014). Son virus envueltos cuyo genoma consiste de una hebra de ARN positiva de aproximadamente 11.000 nucleótidos. Tienen una estructura esférica y miden aproximadamente 50nm (MacLachlan y Dubovi, 2011).

El virus de la Fiebre del Nilo Occidental o West Nile Virus en inglés (WNV) es miembro del complejo serológico del Virus de Encefalitis Japonesa (Pesko y Ebel, 2012). Es el arbovirus con la distribución mundial más amplia (Kramer et al., 2008; Reisen, 2010). Existen predominantemente dos linajes del virus: I y II; no obstante, algunos autores hablan de cinco linajes: I-V (Lanciotti et al., 2002; May et al., 2011; Pesko y Ebel, 2012). El linaje I es el causante de las recientes epidemias, tanto en Norteamérica como en Europa y Mediterráneo, mientras que el II es de baja virulencia y se mantiene principalmente en regiones subsaharianas en África (Hayer, 2001; Lanciotti et al., 2002; Erdélyi et al., 2007). El linaje I se divide en los subtipos Ia, Ib y Ic (Charrel, 2003; Pesko y Ebel, 2012). El genotipo NY99 y WN02 pertenecen al subtipo Ia y son los responsables de los casos en Norteamérica (Moudy et al., 2007).

Los *Flavivirus* pueden tener varios reservorios (Hollidge et al., 2010), siendo en el caso de WNV las aves (Hayes et al., 2005; Komar y Clark, 2006; Reisen et al., 2006; Knipe y Howley, 2007; Kramer et al., 2008; Pollock, 2008; Morales-Betoulle et al., 2013).

### **1.1.3. Vectores**

Los vectores para Alfavirus y Flavivirus suelen variar localmente (Pesko y Ebel, 2012). Los mosquitos son el vector más destacado, donde los géneros más reconocidos son *Culex sp.* y *Aedes sp.* (Hayes et al., 2005; Forrester et al., 2008; Kramer et al., 2008; Quiroz et al., 2009; Zack y Paessler, 2010; MacLachlan y Dubovi, 2011; Van der Kelen et al., 2012). La infección de vectores puede conllevar a infecciones crónicas (Knipe y Howley, 2007) que se perpetúan a través de transmisión vertical a la descendencia, creando así ciclos endémicos (Fulhorst et al., 1994; Goggard et al. 2003). Tanto *Culex* como *Aedes* tienen presencia reportada en Costa Rica (Calderón et al., 2004, 2009, 2012; Marín-Rodríguez et al., 2009a, 2009b, 2012a, 2012b, 2013).

## **1.2. Justificación**

Costa Rica tiene una de las avifaunas más diversas de América Latina y del mundo, con 902 especies de las aproximadamente 9.000 especies conocidas (Sandoval y Sánchez, 2013). Esta diversidad de aves constituye un escenario idóneo para albergar en función de reservorios la presencia de agentes zoonóticos que utilizan aves en su ciclo selvático.

Estos agentes utilizan múltiples hospederos que suelen tener una gran importancia económica a nivel de salud pública, siendo además en algunos casos, un riesgo para la conservación de especies de animales silvestres en peligro de extinción (Daszak et al., 2000; Altizer et al., 2003; Smith et al., 2006). Esto está directamente asociado con su susceptibilidad a procesos estocásticos como la aparición de nuevas enfermedades (Daszak et al., 2000). Además, la presencia de reservorios está vinculada con el surgimiento de enfermedades denominadas como enfermedades emergentes, que en la mayoría de los casos están asociadas con enfermedades de humanos y animales domésticos (Jones et al., 2008; Tiziana et al., 2008).

A pesar de que se asume que estos agentes infecciosos se mantienen en animales reservorios, estos raramente son adecuadamente identificados (Haydon et al., 2002). Es por esta razón que este estudio busca generar información de línea-base sobre cuáles especies de aves podrían estar asociadas y actuar como reservorios efectivos de Alfavirus y Flavivirus, así como cuáles son los subtipos virales que circulan en ellos. Esto como parte de la información epidemiológica básica, necesaria para comprender los patrones de transmisión de estos agentes.

Históricamente, infecciones con EEV fueron reportadas en personas y equinos de Costa Rica, específicamente en la provincia de Guanacaste en 1970 (Martín et al., 1972). En esa oportunidad se constató infecciones asintomáticas en humanos y caballos con EEV subtipo IE y también se confirmó casos clínicos en ambas especies debido a infecciones con EEV subtipo IB, en la localidad de Cuajiniquil. No se identificó animales reservorios pero se obtuvo 24 aislamientos virales a partir de los vectores *Deinoceritis pseudus* y *Aedes taeniorhynchus* (Martín et al., 1972).

Actualmente, la información epidemiológica sobre Alfavirus y Flavivirus en nuestro país es muy limitada. Los únicos arbovirus que se mantienen en un monitoreo constante son el Virus del Dengue y de Chikungunya, dejando de lado a estos otros virus. De todas las pruebas remitidas al Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud por sintomatología aguda para el virus del Dengue, solo el 51% dieron positivas mediante la prueba de PCR y un 61.3% para ELISA por IgM en el 2013; y un 21.2% para PCR y un 32.6% para ELISA por IgM en el 2014 (Centro Nacional de Referencia Viroológica, 2014; 2015). Basándose en esta información, se muestra la gran cantidad de personas con sintomatología similar al

Dengue que resultan negativas a este, abriendo campo a la posibilidad de que estén infectadas con algún otro arbovirus.

En humanos no hay reportes oficiales de ningún Alfavirus o WNV que esté causando cuadros de este tipo en pacientes. No obstante, existen casos de infecciones con EEE, EEV y WNV en humanos y animales desde el año 2009 (Jiménez-Sánchez, Comunicación Personal). Estos casos se detallan a continuación en el Cuadro 1.

A esto se debe agregar que en otras latitudes se han diagnosticado casos de fiebre hemorrágica fatal causada por WNV, días después de que turistas han retornado a sus países luego de una estancia en Costa Rica (Paddock et al., 2006).

**Cuadro 1.** Casuística por agente y zona diagnosticada en el Laboratorio de Virología.

<b>Año</b>	<b>Agente</b>	<b>Número de Casos</b>	<b>Cantones</b>
2009	EEV	40	Abangares, Bagaces, Cañas, Carrillo, Nandayure, Liberia, Santa Cruz.
	WNV	5	Abangares, Cañas, Liberia.
2010	EEV	28	Abangares, Cañas, Carrillo, Santa Cruz, Tilarán, Aguas Zarcas, Florencia, Guatuso, La Fortuna, Monterrey, Pital, Upala.
2011	EEV	7	Bagaces, Nicoya, Pitahaya, Guatuso, Pital, Upala.
2012	EEV	6	Nicoya, Cutris, Guatuso, Upala.
	WNV	2	Nicoya
2013	EEE	1	Cariari
	EEV	1	Monterrey
	WNV	3	Santa Cruz, Abangares, Orotina
2014	EEV	3	Santa Cruz, Upala
	WNV	3	Santa Cruz, Nicoya, Talamanca

En el ámbito veterinario, se han descrito seroprevalencias de hasta 28% en equinos para WNV en la zona de Guanacaste (Hobson-Peters et al., 2011). Recientemente, se han realizado

más estudios de seroprevalencias en equinos a nivel nacional, para WNV, EEE, EEV y EEO; dando como resultado prevalencias de 57.2%, 62.2%, 43.1% y 17%, respectivamente (Jiménez-Sánchez, Comunicación Personal, 2015).

Igualmente, el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) de Costa Rica ha hecho reportes oficiales de EEE (SENASA, 2009a; SENASA, 2013), EEV (SENASA, 2009b) y WNV (SENASA, 2013) en caballos. Asimismo, existe un reporte clínico de WNV en un mono congo (*Alouatta palliata*) del Caribe sur (Jiménez-Sánchez, Comunicación Personal, 2014) y en un emú (*Dromaius novaehollandiae*) de la zona Pacífico Central (SENASA, 2013), siendo esta especie altamente susceptible a encefalitis virales (Veazey et al., 1994). Para estos reportes de SENASA, el diagnóstico definitivo se ha realizado en el Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Sin embargo, en cuanto al virus de EEO, aún no existen reportes de aislamientos en Centroamérica (Zack y Paessler, 2010).

Para el WNV, se han realizado múltiples estudios y se conoce cuáles especies de aves son amplificadores para climas templados de Norteamérica, en donde predominan siempre las aves passeriformes (Bernard, 2001; Rappole, 2000; Stout et al., 2005; Loss et al., 2009; Nemeth et al., 2009; Saito, 2009; Guerrero-Sánchez, 2011; Pesko y Ebel, 2012; Wheeler et al., 2012a; Gale y Johnson, 2014). Las especies *Passer domesticus* y *Turdus migratorius* han sido identificadas como principales amplificadores de este virus en estos estudios.

En la actualidad, solo hay un estudio publicado acerca de la seroprevalencia de WNV en aves de Guatemala, en el cual se identificó a *Quiscalus mexicanus* (Zanate) y *Turdus grayi* (Yigüirro) como potenciales reservorios del virus (Morales-Betoulle et al., 2013). Estas aves tienen una amplia distribución y densidad poblacional en nuestro país (Garrigues y Dean, 2007).

En el caso de los Alfavirus, se sabe que para el EEE, las aves son el reservorio en el ciclo selvático (MacLachlan y Dubovi, 2011). Asimismo, existen estudios respecto al incremento de prevalencia con el aumento de densidad poblacional de una determinada especie de ave (Estep et al., 2013). También, se ha descrito la susceptibilidad de las aves a la infección por EEE (Arrigo et al., 2010b). No obstante, no existen publicaciones acerca de cuáles especies son los principales reservorios de Alfavirus en el neotrópico.

Howard, et al. (2004) no encontraron diferencias significativas en cuanto a la seroprevalencia por especies en una zona endémica a EEE en Norteamérica. Para EEV, las aves costeras se han sugerido que forman un papel importante en la dispersión del virus (Weaver et al., 2004), mencionándose como posibles reservorios en algunos trabajos en la década de los setentas (Bowen y McLean, 1977).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Generar información de línea base al establecer la presencia de arbovirus (EEE, EEO, EEV y WNV) en aves silvestres, en las zonas donde se han reportado brotes de encefalitis en equinos.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- a) Identificar las áreas donde existen reportes de casos de equinos con cuadros de encefalitis para establecer su relación con los virus identificados en estos brotes.
- b) Aislar virus de EEE, EEO, EEV y WNV de muestras provenientes de aves silvestres de vida libre capturadas en los lugares donde ha habido eventos recientes de encefalitis.

- c) Secuenciar genes selectos de los virus aislados para establecer sus relaciones filogenéticas.
- d) Identificar las especies de aves positivas en cada aislamiento realizado para describir sus características ecológicas.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Número de muestra**

Por ser un estudio de línea base, el número de muestra fue el de los animales capturados (muestra por conveniencia o *chunk*) en las visitas a los puntos seleccionados.

## 2.2. Puntos de Muestreo

Se seleccionaron seis puntos de muestreo cercanos a zonas con historial de caso positivo a alguno de los cuatro virus en estudio (Cuadro 2). A cada punto se le dio un atributo de acuerdo con su historial. Para las zonas con presencia de varios casos en equinos y/o humanos ( $n > 2$ ) en los últimos años, se le consideró zonas endémicas (ZE) y a las que solo han presentado un caso, se les llamó caso aislado (CA). El punto ubicado en Carara no ha tenido casos reportados, por lo que se considera como no definido (ND).

**Cuadro 2.** Puntos de Muestreo.

<b>Punto</b>	<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Distrito</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Atributo</b>
Cedral	Limón	Pococí	Cedral	10°32'28.32"N 83°41'43.91"O	CA
Orotina	Alajuela	San Mateo	San Mateo	10°20'5.28"N 84° 8'45.33"O	CA
San Miguel	Heredia	Sarapiquí	Horquetas	10°20'5.28"N 84° 8'45.33"O	ZE
Carara	Puntarenas	Garabito	Garabito	9°46'51.71"N 84°36'21.36"O	ND
Pueblo Viejo	Guanacaste	Nicoya	Mansión	10°7'2.14"N 85°20'44.38"O	ZE
Punta Morales	Puntarenas	Puntarenas	Chomes	10°3'58.61"N 84°57'27.19"O	ZE

Todos los puntos de muestreo, excluyendo Carara, tienen una fuerte presión antropogénica, ya que consisten en zonas con parches boscosos aislados y/o comunicados por bosques de galería. Carara es considerado mayormente un bosque primario en muy buen estado de conservación (SINAC, 2015).

## 2.3. Muestreo en Campo

### 2.3.1. Captura de especímenes

Las aves se capturaron con redes de niebla de poliéster de 32 mm (Avinet®). Se colocaron alrededor de dos a diez redes por sitio de captura. Las redes fueron colocadas entre parches boscosos y zonas abiertas, y en bosques de galería, aumentando el éxito de captura de aves que pudieran utilizarlos como zonas de paso (NABC, 2001; Matlock Jr., et al., 2002; Gosler, 2004). Los bosques de galería fueron los puntos de red más utilizados, ya que se intentó capturar especies que pudieran fluir entre zonas alteradas y zonas de crecimiento secundario o bosque maduro (Matlock Jr. et al., 2002).

Las redes fueron abiertas a las 5:30 a.m. durante todos los días de captura y cerradas a las 4:00 p.m. Se revisaron cada 20 minutos para verificar si se había atrapado algún individuo, de acuerdo con lo recomendado por varios autores (NABC, 2001; Gosler, 2004). En caso de lluvia intensa, las redes fueron cerradas hasta que la lluvia cesara para ser reabiertas nuevamente.

### **2.3.2. Toma de muestras**

Las muestras fueron tomadas mediante venipunción utilizando jeringas de tuberculina y agujas de ½ pulgada y 30G de calibre. La zona por punzar se desinfectó con etanol al 70%, lo cual facilitó la visualización de las estructuras anatómicas. La vena y técnica utilizada dependió del tamaño y facilidad de manipulación del individuo, siendo la vena yugular derecha, basilar o metatarsal las opciones para considerar (Clark et al., 2009).

Aquellos animales que murieron en la red o durante la manipulación fueron sometidos a necropsia y se tomó muestra de órganos. Las identificaciones se realizaron utilizando las descripciones establecidas en las guías de aves para Costa Rica (Stiles y Skutch, 2007; Garrigues y Dean, 2014) u otra guía complementaria con especies presentes en Costa Rica (Sibley, 2000).

### **2.3.3. Almacenamiento de muestras**

Las muestras fueron centrifugadas para separar el suero del coágulo. Una vez retraído el coágulo, el suero fue almacenado para futuros estudios de seroprevalencia. El coágulo y órganos fueron almacenados en crioviales con los siguientes medios: RPMI (Gibco®) con antibiótico (Sigma®) y medio estabilizador de ARN (Life Technologies®). Tanto los crioviales que contenían suero como coágulo fueron almacenados dentro de un tanque con nitrógeno líquido (Taylor-Wharton® CX 100), con el fin de preservar así la integridad del virus y anticuerpos, para su posterior análisis en condiciones de laboratorio.

## **2.4. Análisis de Laboratorio**

### **2.4.1. Aislamiento Viral**

Las muestras obtenidas fueron procesadas en el Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, Costa Rica. El aislamiento viral se realizó mediante la inoculación de células de la línea celular C6/36.

#### **2.4.1.1. Crecimiento de Células**

Las células C6/36 fueron propagadas en botellas plásticas de cultivo (CytoOne®) de 75cm<sup>2</sup>. Posteriormente fueron desprendidas utilizando una escobilla de silicón y suspendidas en 10 mL de medio RPMI suplementado con cinco por ciento de suero fetal bovino (SFB) (Sigma®) y Penicilina, Estreptomina y Anfotericina B (Sigma®) al 1x. Se añadió un mililitro de células suspendidas en cuatro ml de medio RPMi con la misma cantidad de SFB y antimicrobianos a una botella de cultivo de 25cm<sup>2</sup> y se incubó hasta observar una monocapa de células en la

botella. Esta línea celular ha demostrado ser susceptible a la infección por Alfavirus y Flavivirus (White, 1987; Brackney et al., 2010; MacLachlan y Dubovi, 2011; Wheeler et al., 2012b).

#### **2.4.1.2. Inoculación de células**

##### **2.4.1.2.1. Preparación del Inóculo**

Las muestras de coágulo y órgano se descongelaron a temperatura ambiente (22° C). El coágulo de sangre o un fragmento de órgano fue macerado en un tubo Eppendorf con Medio RPMi (Gibco®) en una proporción de 1:2. Posteriormente el macerado fue clarificado mediante centrifugación a 14.500 rpm.

##### **2.4.1.2.2. Inoculación**

El medio de crecimiento de las células C6/36 confluentes fue retirado y sustituido con cuatro mL de medio de mantenimiento, conteniendo 2% de SFB, luego se inoculó un mL de sobrenadante de la muestra. Debido a la poca adherencia de la línea C6/36, el inóculo no fue lavado posteriormente, para evitar el desprendimiento de la monocapa. Este primer pasaje fue observado diariamente en busca de efecto citopático o contaminación de este. En caso de observarse contaminación bacteriana o fúngica, el inóculo fue repetido. En caso de observar un efecto citopático o una disminución severa en la monocapa, el cultivo fue congelado. Al cabo de una semana los cultivos fueron congelados a -80° C.

##### **2.4.1.2.3. Pasajes**

Las botellas inoculadas fueron descongeladas a temperatura ambiente. Posteriormente utilizando pipetas Pasteur, se llenaron dos crioviales de 1.8 ml con el primer pasaje y se almacenaron a -80°C como respaldo. El volumen restante del primer pasaje fue utilizado como

inóculo en una nueva botella de cultivo con monocapa de C6/36. Se inoculó repitiendo la metodología del primer pasaje. Finalmente, fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción de ARN.

## **2.4.2. Análisis Moleculares**

### **2.4.2.1. Extracción de ARN**

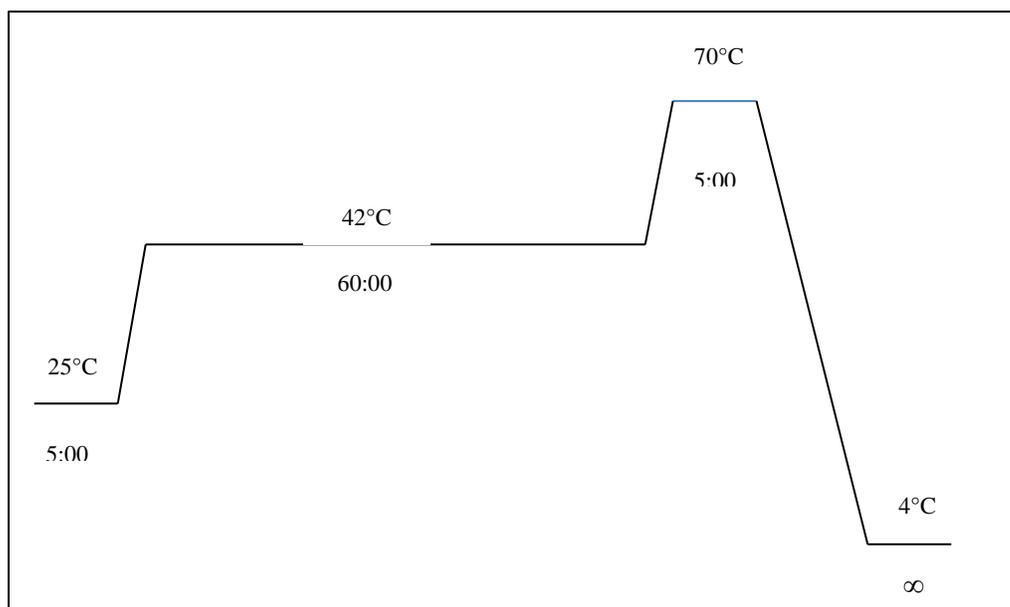
Las botellas del segundo pasaje fueron descongeladas a temperatura ambiente. La monocapa fue desprendida mediante pipeteo vigoroso utilizando el mismo medio celular. Una vez que la monocapa fue desprendida, se llenó un tubo Eppendorf de 1.5 mL y el volumen restante fue nuevamente almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se centrifugó el tubo Eppendorf a 5.000 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante fue decantado, se lavó el pellet de células con PBS agitando en un Vortex® el pellet durante un minuto a 2.000 rpm centrifugándolas nuevamente a 5.000 rpm durante cinco minutos. Posteriormente, se inició el proceso de extracción de ARN utilizando el kit de purificación GeneJET® de Thermo Scientific®, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez eluido el ARN, se prosiguió inmediatamente a la síntesis del ADN complementario (cDNA).

### **2.4.2.2. Síntesis de cDNA**

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el Kit RevertAID Revert Transcriptase de Thermo Scientific®, mezclando 11  $\mu\text{L}$  de ARN de la muestra junto con cuatro microlitros de 5X Reaction Buffer, 1  $\mu\text{L}$  de RiboLock™ RNase Inhibitor (20u/ $\mu\text{L}$ ), dos microlitros de 10mM dNTP mix, un microlitro de RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ $\mu\text{L}$ ) y

realizando la reacción en un termociclador (Applied Biosystems®) mediante el protocolo de retrotranscripción (cDNA) de ARN viral (Figura 1).



**Figura 1.** Descripción del protocolo de retrotranscripción (cDNA) de ARN viral.

#### **2.4.2.3. Amplificación de ADN Viral**

Se realizaron un total de cuatro amplificaciones por muestra, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La mezcla de reactivos fue la misma para los diferentes protocolos, consistiendo de 25  $\mu$ L de Master Mix™ (ThermoScientific®), 18,5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, 2,5  $\mu$ L de Dimetilsulfóxido (Sigma®), 1  $\mu$ L de cada primer específico a cinco mmolar y dos microlitros de cDNA de la muestra. La primera amplificación realizada fue para WNV, utilizando una modificación al protocolo descrito por Lanciotti et al. (2000), el cual consistía de un proceso de desnaturalización de 1:30 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 1:00 min. a 55°C y 3:00 min. a 68°C, finalmente, se realizó la extensión a 68°C durante 5:00 min.

Para los Alfavirus, se realizaron los protocolos descritos por Linssen et al. (2000); utilizándose *primers* y ciclo de amplificación específicos para cada agente etiológico (Cuadro 3). El protocolo para EEE consistió en una reacción de PCR anidado iniciando con un PCR de consenso mediante un primer ciclo de amplificación de 1:30 min. a 94°C, 1:30 min. a 64°C y 1:30 min. a 72°C, seguido de 35 ciclos de 20 s a 94°C, 30 s a 64°C y 20 s a 72°C, finalizando con una extensión de 5:00 min a 72°C. Luego se realizó el PCR anidado, el cual consistía de una primera fase de 1:30 min. a 94°C seguido de 25 ciclos de 20 s a 94°C, 35 s a 65°C y 17 s a 72°C finalizando con 4:00 min. a 72°C.

**Cuadro 3.** Secuencias de *primers* utilizados en los distintos PCRs

Agente	PCR	<i>Primers</i>	Secuencia (5'-3')
WNV		WNV-233	TTGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTT
		WNV 640	CAGCCGACAGCACTGGACATTCATA
EEE	Consenso	EEE-4	CTAGTTGAGCACAAACACCGCA-
		EEE-7	CACTTGCAAGGTGTCGTCTGCCCTC
	Anidado	EEE-5	AAGTGATGCAAATCCAACCTCGAC
		EEE-6	GGAGCCACACGGATGTGACACAA
EEV	Consenso	VEE-2	ACCACCTGGGAGTCCTTGGA
		cVEE-4	TGGCTGGTGAATCCATTCT
	Semi-anidado	VEE-2	ACCACCTGGGAGTCCTTGGA
		VEE-3	TTGGCTCGGCATCGTGTTCGCG
EEO	Consenso	WEE-1	GTTCTGCCCGTATTGCAGACACTCA
		cWEE-3	CCTCCTGATCTTTTTCTCCACG

Semi-anidado	WEE-2 cWEE-3	GTCTTTTCGACCACGACCATG CCTCCTGATCTTTTTCTCCACG
--------------	-----------------	---

---

Para EEV se utilizó un protocolo de PCR semianidado, el cual consistía de un PCR consenso de 1:30 min. a 94°C seguido de 35 ciclos de 20 s a 94°C, 30 s a 68°C y 17 s a 72°C, finalizando con 5:00 min. a 72°C. El PCR semianidado similar al de EEE, ajustando únicamente la temperatura de alineación a 68°C.

Finalmente, el protocolo de PCR para EEO consistió en un PCR anidado muy similar al descrito para EEE, únicamente se variaron las temperaturas de alineación en ambos ciclos del PCR consenso siendo 64°C y 63°C, respectivamente.

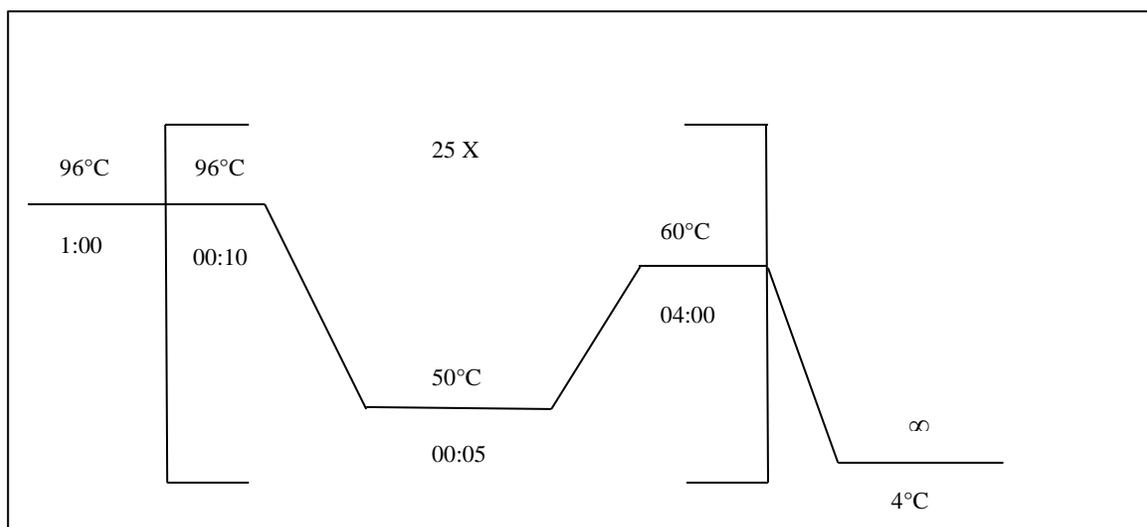
Posteriormente, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 2% con un microlitro de Gel Red®, colocando dos microlitros de producto del PCR de cada muestra junto a dos microlitros de DNA Loading 6X. La electroforesis se corrió a 80 V durante una hora en el amortiguador TBE (TrisBASE-Acido Borico-EDTA).

Los geles fueron observados bajo luz ultravioleta y se consideraron positivas las muestras con un peso molecular cercano al control positivo y al peso molecular esperado del producto para cada agente etiológico.

#### **2.4.2.4. Secuenciación de ADN**

Las muestras positivas fueron purificadas recortando las bandas de ADN en el gel de electroforesis de mismo peso molecular al control positivo y luego se utilizó el kit PureLink™ Quick Gel Extraction™ (Invitrogen®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Una vez purificada la banda del producto de PCR, se procedió a medir la concentración de



ADN utilizando el dispositivo NanoDrop 2000<sup>®</sup>. Una vez conocida la concentración de ácidos nucleicos, se procedió a preparar cada segmento de ADN para la secuenciación de cada hebra utilizando el “BigDye<sup>®</sup> Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit”. Para ello, se ensambló una reacción que contenía: cuatro microlitros de “Ready Reaction Premix”, dos microlitros de “BigDye Sequencing Buffer”, 3.2 pmol del primer forward/reverse específico para cada hebra y ADN según la cantidad sugerida por el fabricante; no obstante, en caso de no obtener una lectura apropiada al secuenciar, se utilizaron cantidades totales de hasta 60 ng.

Por último se agregó agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen de 20  $\mu$ L. La reacción fue realizada en un termociclador con una rampa térmica rápida (1° C/ s), siguiendo el ciclo de amplificación descrito en la Figura 2.

**Figura 2.** Ciclo de amplificación para BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1

Una vez terminado el ciclo de amplificación, se purificó cada hebra utilizando el kit PureLink PCR Purification Kit™ (Invitrogen®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La secuenciación fue realizada en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica. La técnica utilizada fue el método de Sanger mediante electroforesis capilar.

#### 2.4.2.5. Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos fueron realizados con base en las regiones amplificadas de los diferentes PCR (Cuadro 4). Los nucleótidos secuenciados fueron alineados utilizando el software MEGA 6®. Se utilizó la herramienta BLAST™, del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI) de la Librería Nacional de Medicina de Estados Unidos, para buscar secuencias almacenadas en GeneBank®, altamente homólogas, a la secuencia de cada muestra.

**Cuadro 4.** Regiones amplificadas por PCR

Virus	Región (Gen)	Tamaño
EEE	9457 (E2) -9697 (E2)	262 bp
EEV	9836 (6K) -10009 (E1)	194 bp.
WNV	233 (C)– 640 (PrM)	408 bp

Las secuencias homólogas identificadas fueron seleccionadas bajos los criterios de “Query Coverage” igual a un 100% y un “Max Ident” mayor o igual a 97% dando, además, prioridad a secuencias recientes y de países cercanos a Costa Rica. Además de estas secuencias, también se

descargaron secuencias pertenecientes al complejo viral para analizar, así como otros virus emparentados, con el fin de ilustrar mejor la relación filogenética de cada secuencia aislada.

Los árboles filogenéticos fueron elaborados mediante el software MEGA6®. Se utilizó el método de Maximum Like-hood con el modelaje de Jukes-Cantor y un bootstrap de 2.000 réplicas. Debido al corto tamaño de las secuencias, se midió la distancia promedio Jukes-Cantor de parejas, para asegurarse que eran adecuadas para este tipo de modelaje. Todas las secuencias fueron mayores a 1.0, el cual es el mínimo requerido para un óptimo análisis (Hall, 2011).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Especies

Se capturaron un total de 100 individuos de 52 especies incluidas en 21 familias (Cuadro 5). Debido a las zonas donde se colocaron las redes, la mayoría de especies corresponden a géneros que suelen frecuentar paisajes alterados. Las principales especies capturadas fueron *Sporophila corvina*, *Amazilia tzacat*, ambas especies residentes y *Protonotaria citrea*, especie migratoria. (Stiles y Skutch, 2007).

**Cuadro 4.** Especies Capturadas

Familia	Especie	Cant.	Familia	Especie	Cant.
Alcedinidae	<i>Chloroceryle americana</i>	4	Pipridae	<i>Manacus candei</i>	1
Cardinalidae	<i>Piranga rubra</i>	2	Psittacidae	<i>Pionus senilis</i>	1
	<i>Passerina cyanea</i>	1	Thamnophilidae	<i>Myrmeciza exsul</i>	2
Columbidae	<i>Columbina inca</i>	1		Thraupidae	<i>Thamnophilus bridgesi</i>
	<i>Columbina talpacoti</i>	1	<i>Chlorophanes spiza</i>		1
Emberizidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	1	<i>Ramphocelus passerinii</i>	2	
	<i>Sporophila corvina</i>	12	<i>Tangara larvata</i>	2	

	<i>Tiaris olivaceus</i>	1	Trochilidae	<i>Amazilia rutila</i>	2
Formicariidae	<i>Formicarius analis</i>	1		<i>Amazilia saucerrottei</i>	2
Fringillidae	<i>Euphonia gouldi</i>	3		<i>Amazilia tzacatl</i>	8
Furnariidae	<i>Dendrocolaptes sanctithomae</i>	1		<i>Glaucis aeneus</i>	1
	<i>Glyphorhynchus spirurus</i>	2		<i>Phaethornis striigularis</i>	1
	<i>Synallaxis brachyura</i>	1		<i>Thalurania colombica</i>	1
	<i>Xiphorhynchus erythropygius</i>	1	Troglodytidae	<i>Campylorinchus rufrifrons</i>	1
Grallariidae	<i>Hylopezus perspicillatus</i>	1		<i>Thryothorus pleurostictus</i>	1
Incertae sedis	<i>Coreba flaveola</i>	1		<i>Troglodytes aedon</i>	1
Momotidae	<i>Eumomota superciliosa</i>	1	Turdidae	<i>Turdus grayii</i>	3
Parulidae	<i>Protonotaria citrea</i>	9	Tyrannidae	<i>Epidomax virescens</i>	1
	<i>Dendroica petequia</i>	1		<i>Myarchus nuttingi</i>	2
	<i>Parkesia noveboracensis</i>	4		<i>Myiarchus tyrannulus</i>	1
	<i>Oreothlypis peregrina</i>	1		<i>Myiozetetes similis</i>	5
	<i>Basileuterus rufifrons</i>	1		<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	3
	<i>Phaeothlypis fulvicauda</i>	2		<i>Tyrannus melancholicus</i>	1
Picidae	<i>Melanerpes hoffmannii</i>	1	Vireonidae	<i>Vireo flavifrons</i>	1

### 3.2. Aislamientos

Se lograron cinco aislamientos positivos de un total de seis especies en tres diferentes localidades (Cuadro 6).

**Cuadro 5.** Aislamientos Virales por especie.

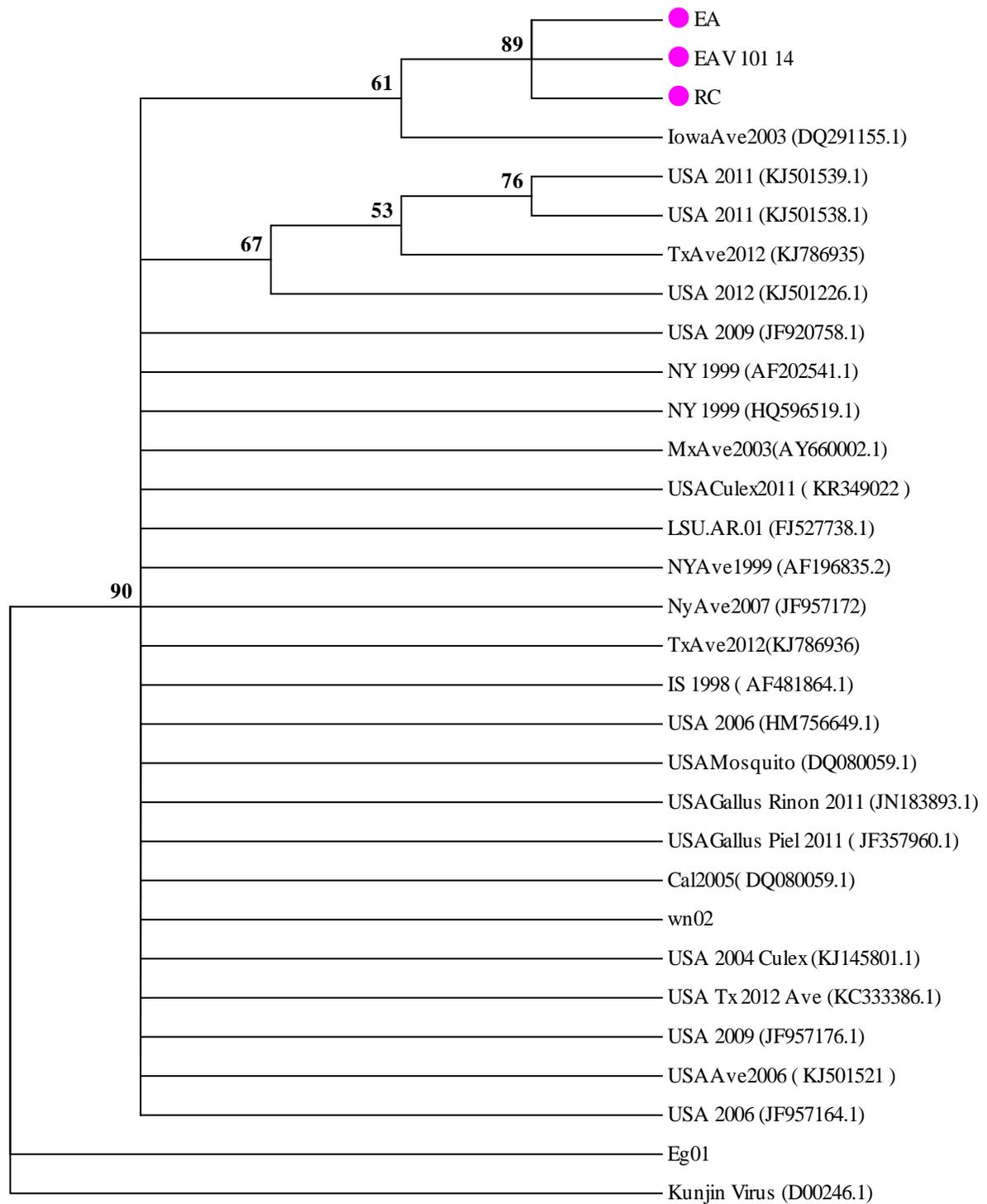
Código	Especie	Localidad	WNV	EEE	EEV	EEO
EAV_05_13	<i>Manacus candei</i>	Cedral	(-)	(-)	(+)	(-)
EAV_02_14	<i>Columbina talpacoti</i>	San Miguel	(-)	(+)	(-)	(-)
EAV_06_14	<i>Chlorophanes spiza</i>	San Miguel	(+)	(-)	(-)	(-)
EAV_53_14	<i>Protonotaria citrea</i>	Punta Morales	(-)	(+)	(-)	(-)
EAV_55_14	<i>Vireo flavifrons</i>	Punta Morales	(-)	(+)	(-)	(-)

### 3.3. Secuenciación

#### 3.3.1. West Nile Virus

El árbol filogenético para WNV (Figura 3) muestra en su mayoría aislamientos realizados en distintas especies en Estados Unidos, ya que fueron las más similares a la hora

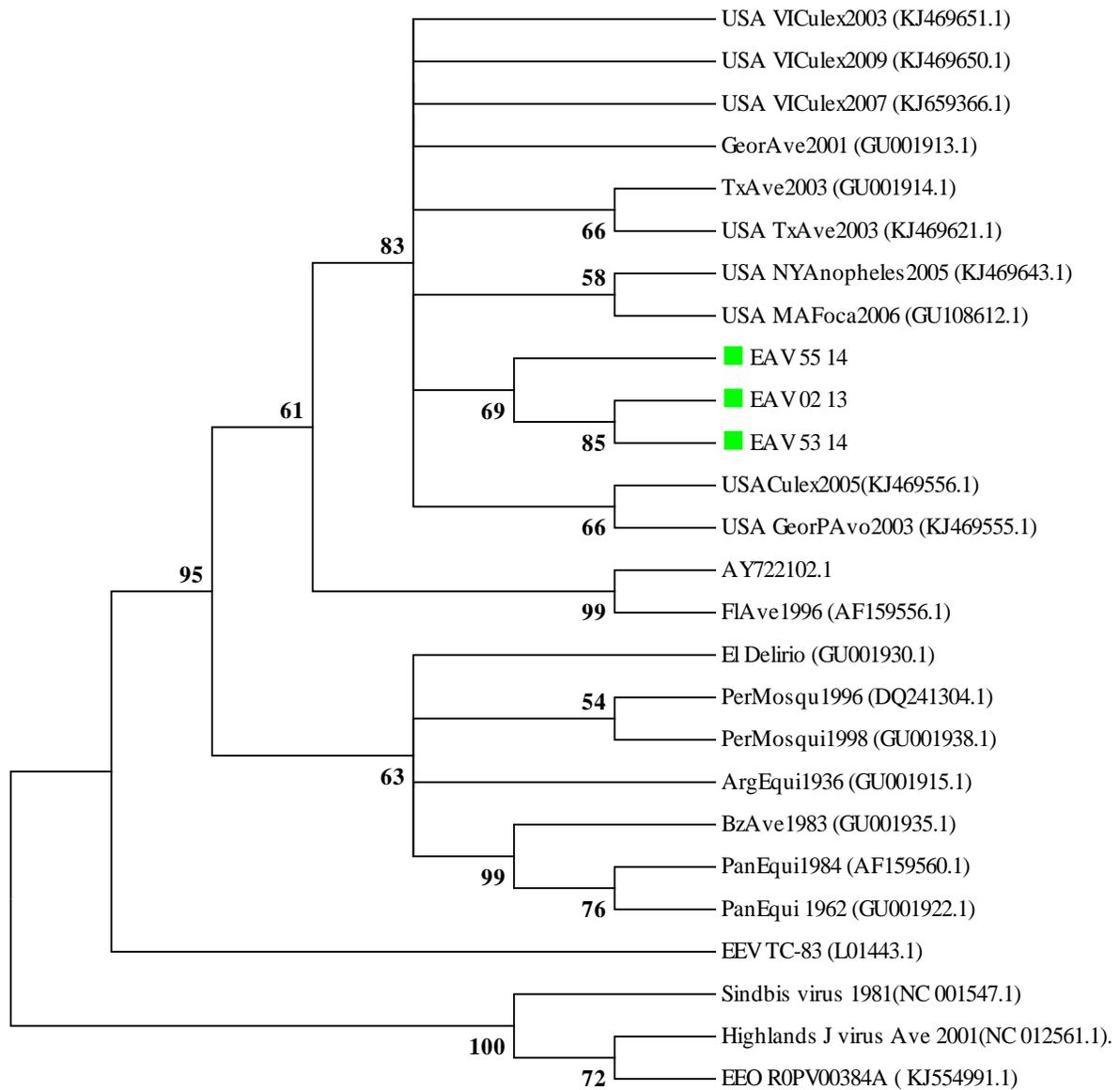
de utilizar la herramienta BLAST™. Además se incluyeron aislamientos realizados en Israel y Egipto, ya que son los antecesores del subtipo NY99. Finalmente, se incluyeron las secuencias “RC” y “EA”, las cuales son aislamientos realizados en el país en el año 2013 y 2010, respectivamente.



**Figura 3.** Análisis filogenético de los aislamientos de WNV.

### **3.3.2. Encefalitis Equina del Este**

Debido a la alta diversidad genética que presenta el virus de EEE (Figura 4), se decidió utilizar, adicional a las secuencias semejantes, secuencias de otros subtipos presentes en el continente, para dar una mayor representación de las diferentes ramas que comprende este

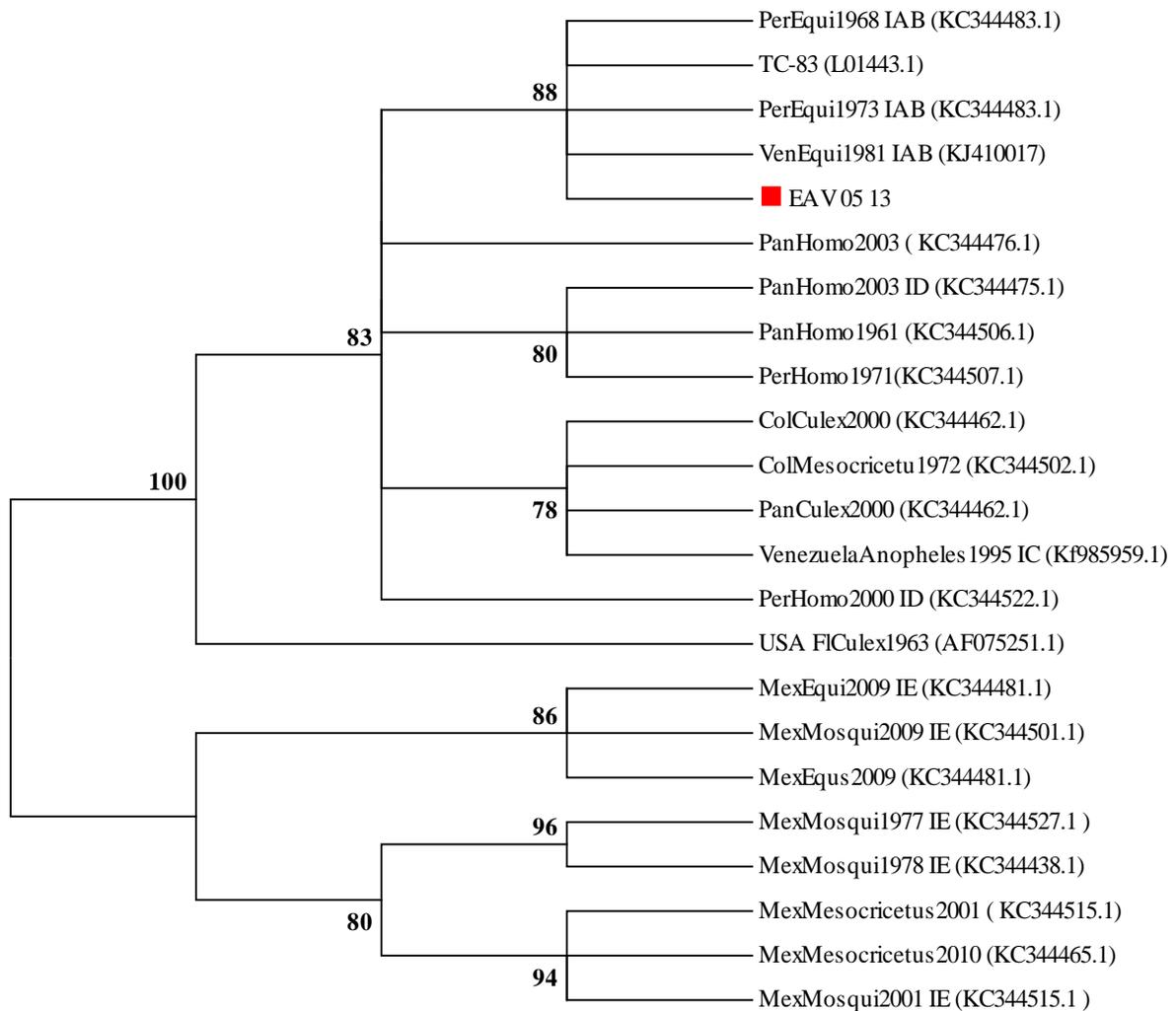


complejo viral. Asimismo, se incluyeron otros virus como EEO y Highland J para ilustrar mejor la complejidad del género Alfavirus.

**Figura 4.** Análisis filogenético de los aislamientos de EEE.

### 3.3.3. Encefalitis Equina Venezolana

El virus de la EEV tiene varios subtipos circulando en México y Centroamérica, por lo



que se utilizaron secuencias pertenecientes a esta región. Debido a la gran cantidad de subtipos virales presentes en Suramérica, se omitió incluirlas para enfocar el análisis en los subtipos circulantes en nuestra región (Figura 5).

**Figura 5.** Análisis filogenéticos de los aislamientos de EEV.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Arbovirosis en Costa Rica

La epidemiología de las enfermedades vectoriales suele requerir investigaciones extensas para dilucidar la dinámica ambiental de estos agentes. Actualmente, existe serología positiva a IgG en equinos a WNV, EEE, EEV y EEO en toda Costa Rica (Jiménez, 2015), lo que sugiere que existen reservorios a lo largo de todo el país. No obstante, en este estudio no se lograron aislar los cuatro agentes etiológicos. Se logró el aislamiento viral de WNV y EEE, los cuales según se describe en la literatura utilizan aves como amplificadores; así como virus de EEV, que utilizan, principalmente, roedores como reservorios.

Las tasas de aislamiento fueron de 0.98% para WNV, 2.9 % para EEE, 2.9% para EEV y 0% para EEO. Las tasas de aislamiento entre los distintos arbovirus suele diferir de manera importante entre ellos, ya que depende de una gran cantidad de factores, tales como la memoria inmunológica de la población susceptible, competencia vectorial y densidad de reservorios.

La descripción de tasas de aislamiento de arbovirus es escasa en la literatura, no obstante, se han descrito tasas de aislamiento de 6.7% (215 de 3189) en pacientes asintomáticos con Dengue (Méndez et al., 2006) y de 0.7% (30 de 4023) en epiornitias de EEE (Howard et al., 2004).

Otro factor necesario para considerar es que la tasa de aislamiento viral suele aumentar considerablemente ante la ocurrencia de brotes (Howard et al., 2004), lo cual fue una limitante importante en este estudio, dada la baja cantidad de zonas muestreadas en curso de un brote activo; solamente la zona de San Mateo de Alajuela y Cedral de Limón fueron muestreadas durante un brote activo. Esto se debe a que en el país se da una vigilancia epidemiológica pasiva y no activa, lo que retarda la capacidad de respuesta ante un brote.

El hecho de aislar el virus en un animal asintomático es un primer paso para considerar dicha especie como un reservorio. No obstante, para ser catalogado como reservorio, es necesario aislar el virus, tener altas prevalencias de anticuerpos en la población y mantener viremias prolongadas (Haydon et al., 2002; Kuno y Chang, 2005).

La medición de viremias en campo es muy compleja, por lo que los estudios realizados han sido estudios a nivel de laboratorio, en donde se han detectado viremias en aves de aproximadamente siete días para WNV (Komar et al., 2003) y dos días para EEE (McLean, 1995).

En la última década se ha propuesto que las aves, como no se mantienen infectadas de por vida con arbovirus, no cumplen con la definición clásica de reservorio, por lo que algunos autores proponen que su papel es de “huésped enzoótico” (Kuno y Chang, 2005) o de amplificador enzoótico (Kramer et al., 2008).

Muchas de las aves con algún aislamiento son aves que suelen ser depredadas por otras aves o por mamíferos, resaltando así la posibilidad de que las aves no solo funcionen como reservorio ante un vector, sino que también infecten a especies que se ubiquen arriba en la cadena trófica (Komar et al., 2003; Austgen et al., 2004; Nemeth et al., 2006; Saito et al., 2007) en donde es

necesario considerar también a gatos domésticos, los que comúnmente depredan aves silvestres (Loss et al., 2012).

Si bien es cierto que aún se desconoce cuáles son los artrópodos que funcionan como vectores para estos virus en territorio nacional, en otras latitudes, han sido identificados mosquitos que se alimentan tanto de aves como de mamíferos, creando así un puente entre aves y mamíferos (Kilpatrick, 2011). Asimismo, es de esperar que en los casos donde existe un ciclo selvático, las aves con afinidad a varios nichos ecológicos, faciliten el salto de ciclo selvático a ciclo doméstico.

#### **4.1.1. West Nile Virus**

La incidencia de WNV en humanos y equinos en Latinoamérica ha sido considerablemente menor a las reportadas en Norteamérica (Komar y Clark, 2006). Asimismo, en el neotrópico no se han registrado grandes mortalidades en aves por West Nile (Kramer et al., 2008).

Aun así, la seroprevalencia en equinos es del 52% (Jiménez-Sánchez, Comunicación personal, 2015) lo que demuestra que es un virus extensamente distribuido en el territorio nacional. A pesar de ser un virus ampliamente distribuido, su incidencia en humanos y equinos no ha sido igual de severa que en otras latitudes. Se han descrito varios factores que han podido evitar escenario igual al norteamericano en el trópico, las cuales se discuten a continuación.

En América tropical es común la circulación de diferentes Flavivirus como los son el Virus del Dengue, Virus de la Fiebre Amarilla y Virus de la Encefalitis de San Luis; si bien es cierto que estos virus no producen inmunidad protectora entre ellos, sí hay aumento de títulos de anticuerpos debido a reacciones cruzadas entre distintos Flavivirus (Makino et al., 1994), por lo

que algunos autores argumentan que puede existir inmunidad cruzada limitando así los efectos de un virus nuevo en una población endémica a otros Flavivirus (Gould y Higgs, 2009).

De igual manera, los patrones de alimentación de vectores en Norteamérica, en especial *Culex pipiens*, han potenciado la aparición de casos en humanos (Kilpatrick et al., 2006). Por ello, varios ecólogos han propuesto el “efecto de dilución” como una barrera para West Nile, argumentando que en zonas con gran biodiversidad de reservorios, los vectores van a tener menos probabilidades de inocular amplificadores efectivos, ya que al haber más variedad de especies, la proporción de especies amplificadoras va a disminuir, reduciendo así aves con capacidad de transmitir el virus a otros vectores (Ostfeld y Keesing, 2000; Keesing et al., 2006; Allan et al., 2009; Keesing et al., 2010; Ostfeld y Keesing, 2012).

Asimismo, en Norteamérica, la cantidad de mosquitos aumenta a finales de verano y en otoño, concentrando así los vectores y la diseminación, pero en el trópico puede ocurrir transmisión todo el año sin tener picos de casos debido a la constante presencia de mosquitos (Marra et al., 2004).

#### **4.1.2. Alfavirus**

Desde los años setentas, se han documentado aislamientos de EEV, EEE y EEO en sus reservorios silvestres. (Williams et al., 1971; Shope y Woodall, 1973). La ecología e historia natural de las aves con aislamiento viral se perfila como muy heterogénea para los Alfavirus, ya que en otras latitudes no se ha demostrado predilección por ninguna especie en particular (Howard et al., 2004).

A pesar de que la literatura actual considera principalmente a roedores de los géneros *Sigmodon*, *Oryzomys*, *Zygodontomys*, *Heteromys*, *Peromyscus*, y *Proechimys* como reservorios del virus de EEV (Ferro et al., 2003; Weaver et al., 2004; Carrara et al., 2005), en estudios realizados entre los años cincuentas y setentas, se consideraba a las aves silvestres como un reservorio importante para este virus (Chamberlain et al., 1956; Dickerman & Bonacorsa, 1972, Dickerman et al., 1972; Bowen y McLean, 1977).

Algunos autores aún siguen mencionando a las aves playeras como reservorios (Weaver et al., 2004). A pesar de esto, *Manacus candei* es una especie de sotobosque que puede habitar hasta los 900 m.s.n.m. (Garrigues y Dean, 2014), por lo que ciertamente existe la posibilidad de que aves que habitan en bosques sean parte importante del ciclo selvático.

En cuanto a EEO, no se logró ningún aislamiento de este virus. Según Zack y Paessler (2010), el virus de EEO no se ha detectado al sur de Yucatán (Zack y Paessler, 2010), por lo que no es extraño no tener individuos positivos. Además, este virus ha disminuido su incidencia en áreas endémicas, por razones desconocidas (Naomi et al., 2008).

## **4.2. Filogenia**

### **4.2.1. West Nile**

La secuenciación de WNV (Figura 3) determinó que el virus aislado es homólogo a otros aislamientos realizados en el país a partir de personas enfermas. No obstante, el fragmento de genoma secuenciado no es suficiente para determinar si estos aislamientos pertenecen al subtipo NY99 o WN02, ya que no se acomodan en una rama bien diferenciada.

Si bien es cierto, el subtipo WN02 ha sido el predominante en Norteamérica en los últimos

años, por factores de competencia vectorial (Moudy et al., 2007), es difícil definir si lo mismo está ocurriendo en el ámbito nacional.

Las secuencias RC y EA son aislamientos realizados en Costa Rica en personas en el año 2010 y 2013. La homología entre estas secuencias y EAV\_101\_14 es muy alta, por lo que da indicios de que en Costa Rica únicamente circula un subtipo viral, que sería sugestivo de que hubo una única introducción del virus al territorio nacional. Para confirmar esta hipótesis, sería necesaria una mayor cantidad de aislamientos y analizar mayor cantidad de regiones del genoma viral.

#### **4.2.2. Encefalitis Equina del Este**

Los análisis filogenéticos realizados para EEE (Figura 4) muestran que los aislamientos son muy similares entre sí; sin embargo, dos de ellos son más homólogos. La literatura cita que en la región del Caribe y Norteamérica circula el subtipo viral I, lo que concuerda con la asociación mostrada en el árbol (Figura 4).

No obstante, es necesario corroborar en futuros trabajos si los aislamientos son de virus endémicos o si existe un flujo viral a través de aves migratorias. Por ejemplo, el aislamiento EAV\_55\_14 pertenece a una especie migratoria mientras que EAV\_02\_13 y EAV\_53\_14 pertenecen a especies residentes; esto abre la posibilidad de un constante flujo viral del subtipo I a través de aves migratorias; que correspondería con el patrón migratorio de muchas aves de la costa este de Estados Unidos que migran hacia el Caribe y Centroamérica, tal es el caso de *Protonotaria citrea*.

### **4.2.3. Encefalitis Equina Venezolana**

La secuencia de EEV es similar a aislamientos homólogos a la cepa TC-83, que fue utilizada como control positivo, no obstante, su «Max Ident» fue de un 98% respecto a la cepa TC-83, descartando que sea contaminación esta cepa. Asimismo, en el árbol filogenético (Figura 5) se ubica esta muestra asociada a secuencias de los subtipos IAB y ID; debido a la corta longitud de la secuencia, es difícil establecer una correcta relación filogenética.

Asimismo, en estudios filogenéticos anteriores, se ha descrito que el subtipo IAB evolucionó a partir de un virus similar al ID (Weaver et al., 1999). En estudios anteriores se ha determinado que el subtipo ID abarca la parte norte de Suramérica hasta Panamá. El subtipo IAB es poco común hoy en día, ya que la cepa vacunal pertenece a este subtipo y ha logrado un control sobre este subtipo en el ciclo viral. Este dato se debe tomar con cautela a la hora de interpretarse, ya que el subtipo IAB fue el responsable de las epizootias ocurridas en los años sesentas y setentas.

Por otra parte, se sabe que la cepa vacunal al ser virus vivo, puede tener un ciclo silvestre, ya que ha sido aislada de vectores en zonas donde se ha vacunado anteriormente. Por lo tanto, se necesita mayor investigación y análisis para determinar si este aislamiento es de una cepa virulenta, una cepa IAB atenuada o una cepa vacunal con ciclo silvestre.

### **4.3. Hábitos ecológicos**

La descripción de los hábitos ecológicos es fundamental para especular acerca del papel que puede jugar dicha especie en el ciclo de la enfermedad. Se han descrito en la literatura cómo los hábitos ecológicos del hospedero propician o disminuyen significativamente la incidencia de una enfermedad. Actualmente, en el neotrópico, no existe ningún estudio publicado que describa hábitos ecológicos de los hospederos que influyan en el ciclo de estos virus.

Basados en los hábitos generales para cada especie con aislamiento, se describen los factores que pueden facilitar la infección de estas aves por parte de alguno de los agentes virales descritos, tales como dieta, distribución geográfica y hábitat.

De las especies positivas para EEE, la especie *Protonotaria citrea* habita pantanos boscosos en la costa este de los Estados Unidos (Sibley, 2000), realizando migraciones durante el invierno boreal hasta Centroamérica y el Caribe llegando hasta el norte de Suramérica. En nuestro país visita áreas asociadas a manglares y matorrales adyacentes a ríos (Stiles y Skutch, 2007).

La relación entre zonas endémicas para EEE en Estados Unidos, está claramente asociadas con humedales, como pantanos boscosos (Molaei et al., 2013). En nuestro caso, el *Protonotaria citrea* en Costa Rica abre la posibilidad de que esta especie actúe como reservorio activo y diseminador a otras especies vía vectorial de EEE, especialmente porque el virus que logramos aislar coincide con los virus de EEE reportados en el hemisferio norte (Dusek et al., 2009).

Igualmente, la especie *Vireo flavifrons* es una especie migratoria de la costa este de Estados Unidos, no obstante también tiene una población residente en el país; no es posible determinar si el individuo capturado era residente o migratorio. *Protonotaria citrea* y *Vireo flavifrons* difieren en su hábitat tanto en Norteamérica como en Centroamérica, por lo que ambas especies estarían expuestas a vectores con diferente competencia vectorial. También se debe considerar que la población de *Vireo flavifrons* residente se ve suplementada con individuos migratorios durante el invierno boreal (Sibley, 2000), aumentando la cantidad de amplificadores y pudiendo potenciar así la transmisión entre vectores.

La especie *Columbina talpacoti* es integrante de la familia Columbiforme; en otros estudios también han sido aislados diferentes arbovirus en palomas incluyendo EEE (Gerholdm et al.,

2007). Es posible que el comportamiento forrajeo de estas especies, al ser granívoras principalmente, estén expuestas a vectores a nivel de suelo. Además, esta especie forrajea tanto en zonas alteradas (Stiles y Skutch, 2007), como explotaciones agropecuarias, y zonas boscosas, por lo que podría estar expuesta a vectores del ciclo selvático y epizootico.

En los aislamientos positivos para EEV, las especies son más heterogéneas que para EEE. La especie *Manacus candei* habita en el sotobosque de la vertiente atlántica y ocasionalmente puede visitar jardines o zonas alteradas. Su rango geográfico es únicamente el istmo centroamericano (Stiles y Skutch, 2007), por lo que aumentaría la posibilidad de que funcione como reservorio de un ciclo críptico de EEV y que no se haya detectado en otras latitudes.

El aislamiento positivo para WNV fue de la especie *Chlorophanes spiza*, la cual habita en los bosques húmedos de Costa Rica hasta los 1500 m.s.n.m. (Garrigues y Dean, 2014). Es común observarla en zonas alteradas como jardines y áreas agrícolas, además también visita crecimiento secundario.

A diferencia de EEE y EEV, para WNV no se reporta en la literatura si mantiene ciclos selváticos, por lo que esta especie no serviría de huésped epizootico sino únicamente de amplificador. Para las aves de dieta total o parcialmente insectívora, como lo son *Chlorophanes spiza*, *Vireo flavifrons*, *Protonotaria citrea* (Stiles y Skutch, 2007), es también importante considerar que pudieron adquirir el virus no solo por la inoculación por parte del vector, sino también por la ingestión de un mosquito infectado (Komar, 2003).

## 5. CONCLUSIONES

1. Se generó información epidemiológica de importancia, al lograr establecer la presencia de virus de West Nile, Encefalitis Equina del Este y Encefalitis Equina Venezolana.  
No obstante, no se logró determinar la presencia de Encefalitis Equina.
2. Se identificaron y muestrearon zonas con casos de equinos con cuadros de encefalitis.
3. Las aves que habitan en zonas alteradas por el ser humano tuvieron aislamientos positivos para estos agentes, funcionando así como amplificadores, teniendo una importancia en el ciclo epizootico y epidemiológico de estos agentes.
4. El fragmento de genoma analizado filogenéticamente para el virus de West Nile, es similar a aislamientos realizados en Estados Unidos en distintos años; no obstante, no fue posible determinar el subtipo específico del aislamiento. El virus de la Encefalitis Equina del Este pertenece al Linaje I, concordando con la distribución y filogenia descrita para este agente. No se determinó cuál es el subtipo viral al cual pertenecen los aislamientos del virus de Encefalitis Equina Venezolana debido a la corta longitud del fragmento de genoma analizado.
5. Los hábitos ecológicos de las especies con aislamiento positivo parecen, de manera preliminar, favorecer el papel de huésped enzoótico en estas aves.

## 6. RECOMENDACIONES

- Secuenciar el genoma completo de los virus aislados y buscar variaciones que permitan explicar las diferencias ecológicas observadas entre Norteamérica, Centroamérica y Suramérica.
- Muestrear más zonas del país con el fin de obtener mayor cantidad de aislamientos y así poder realizar análisis acerca de la evolución de estos agentes en el país.
- Realizar estudios a largo plazo en zonas endémicas, utilizando el anillamiento de aves, para así poder describir la incidencia de estos agentes en las poblaciones residentes de aves.
- Efectuar la captura de mosquitos para así determinar cuáles son las especies con potencial de ser los vectores de dichos agentes.
- Realizar técnicas moleculares a hembras grávidas de vectores, para así determinar cuáles aves son la principal fuente de alimentación y entender de una mejor manera el ciclo de estos agentes en el país.
- Asociar los aislamientos con factores ecológicos tanto bióticos como abióticos, mediante el uso de Sistemas de Información Geográfica, logrando establecer así áreas con mayor riesgo de infección en el país.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, A.P., R. Navarro-López, F.J. Ramírez-Aguilar, I. López-González, G. Leal, J.M. Flores-Mayorga, A.P.A. Travassos da Rosa, K.D. Saxton-Shaw, A.J. Singh, E.M. Borland, A.M. Powers, R.B. Tesh, S.C. Weaver & J.G. Estrada-Franco. 2012. Venezuelan equine encephalitis virus activity in the Gulf Coast Region of Mexico 2003–2010. [En línea]. PLOS Neglected Tropical Diseases. 6:11. <http://www.plosntds.org/> (Consulta: 25 ene. 2014).
- Aguilar, P.V., R.M. Robich, M.J. T, M.L. O’Guinn, T.A. Klein, A. Huaman, C. Guevara, Z. Rios, R.B. Tesh, D.M. Watts, J. Olson, & S.C. Weaver. 2007. endemic eastern equine encephalitis in the Amazon Region of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 293-298.
- Allan, B.F., R.B. Langerhans, W. Ryberg, W.J. Landesman, N.W. Griffin, R.S. Katz, B.J. Oberle, M.R. Schutzenhofer, K.N. Smyth, A. De St. Maurice, L. Clark, K.R. Crooks, D.E. Hernandez, R.G. McLean, R.S. Ostfeld, & J.M. Chase. 2009. Ecological correlates of risk and incidence of West Nile virus in the United States. *Oecologia* 158: 699-708.
- Altizer, S., D. Harvell & E. Friedle. 2003. Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution.* 18: 589-596.
- Arrigo, N., A.P. Adams & S.C. Weaver. 2010a. Evolutionary patterns of eastern equine encephalitis virus in North versus South America suggest ecological differences and taxonomic revision. *J. Virol.* 84: 1014-1025.
- Arrigo, N.C., A.P. Adams, D.M. Watts, P.C. Newman & S.C. Weaver. 2010b. Cotton rats and house sparrows as hosts for North and South American strains of eastern equine encephalitis virus. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 1373-1380.
- Austgen, L.E., R. Bowen, M.L. Bunning, B.S. Davis, C.J. Mitchell & G.J. Chang. 2004. Experimental infection of cats and dogs with West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 83-86.
- Barker, C.M., W.O. Johnson, B.F. Eldridge, B.K. Park, F. Melton & W.K. Reisen. 2010. Temporal connections between *Culex tarsalis*. abundance and transmission of western equine encephalomyelitis virus in California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82: 1185–1193.
- Bernard, K.B., J.G. Maffei, S.A. Jones, E.B. Kauffman, G.D. Ebel, A.P. Dupuis II, K.A. Ngo, D.C. Nicholas, D.M. Young, P. Shi, V.L. Kulasekera, M. Eidson, D.K. White, W.B. Stone, NY State West Nile Virus surveillance team & L.D. Kramer. 2001. West Nile Virus infection in birds and mosquitoes, New York State 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 679- 685.
- Bowen, G.S. & R.G. McLean. 1977. Experimental infection of birds with epidemic Venezuelan Encephalitis Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 808-814.
- Brackney, D.E., J.C. Scott, F. Sawaga, J.E. Woodward, N.A. Miller, F.D. Schilkey, J. Mudge, J. Wilusz, K.E. Olson, C.D. Blair & G.D. Ebel. 2010. C6/36 *Aedes albopictus* cells have

- a dysfunctional antiviral RNA interference response [En línea]. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 4:10. <http://www.plosntds.org/> (Consulta: 25 ene. 2014).
- Calderón-Arguedas, O., A. Troyo, & M.E. Solano. 2004. Diversidad larval de mosquitos (Diptera: Culicidae) en contenedores artificiales procedentes de una comunidad urbana de San José, Costa Rica. *Parasitol. Latinoam.* 59: 132-136.
- Calderón-Arguedas, O., A. Troyo, M.E. Solano, A. Avendaño, & J.C. Beier. 2009. Urban mosquito species (Diptera: Culicidae) of dengue endemic communities in the Greater Puntarenas area, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 57: 1223-1234.
- Calderón-Arguedas, O., A. Troyo, M.E. Solano, A. Avendaño, & M. Gutiérrez. 2012. *Aedes albopictus* (Skuse) in the Huetar Atlantic Region of Costa Rica. *Rev. Costarr. Salud Pública.* 21: 76-80.
- Carrara, A.S., G. Gonzales, C. Ferro, M. Tamayo, J. Aronson, S. Paessler, M. Anishchenko, J. Boshell, & S.C. Weaver. 2005. Venezuelan equine encephalitis virus infection of spiny rats. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 663-669.
- Centro Nacional de Referencia Viroológica. 2014. Informe preliminar de vigilancia basada en laboratorio del dengue 2013. [En línea]. Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud. <http://www.inciensa.sa.cr/actualidad/Informes%20de%20vigilancia.aspx> (Consulta: 9 feb. 2014).
- Centro Nacional de Referencia Viroológica. 2015. Datos de análisis serológicos y serotipos circulantes de dengue es de dengue Costa Rica, enero- Costa Rica, enero-diciembre 2014 diciembre 2014 diciembre 2014. [En línea]. Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud. <http://www.inciensa.sa.cr/actualidad/Informes%20de%20vigilancia.aspx> (Consulta: 3 abril. 2015).
- Chamberlain, R.W., R.E. Kissling, D.D. Stanm, D.B. Nelson & R.K. Sikes. 1956. Venezuelan equine encephalitis in wild birds. *Am. J. Epidemiol.* 63: 261-273.
- Charrel, R.N., A.C. Brault, P. Gallian, J.J. Lemasson, B. Murgue, S. Murri, B. Pastorino, H. Zeller, R. de Chesse, P. de Micco & X. de Lamballerie. 2003. Evolutionary relationship between Old World West Nile Virus strains Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology.* 315: 381-388.
- Clark, P., W. Boardman & S. Raidal. 2009. *Atlas of clinical avian hematology*. Willey-Blackwell, Oxford.
- Daszak, P., A. A. Cunningham & A. D. Hyatt. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science.* 287: 443-449.
- Dickerman, R.W. & C.M. Bonacorsa. 1972. Growth of Venezuelan encephalitis virus in embryonic cell cultures of wild birds. *Infect. Immun.* 6: 424-425.

- Dickerman, R. W., W. F. Scherer, A. S. Moorhouse, E. Toaz, M. E. Essex & R. E. Steele. 1972. Ecologic studies of Venezuelan Encephalitis Virus in Southeastern Mexico: VI. Infection of Wild Birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21:66-78.
- Dusek, R.J., R.G. McLean, L.D. Kramer, S.R. Ubico, A.P. Dupuis II, G.D. Ebel, & S. C. Guptill. 2009. Prevalence of West Nile Virus in migratory birds during spring and fall migration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 81: 1151–1158.
- Estep, L.K., C.J.W. Maclure, P. van der Kelen. N.D. Burkett-Cadena, S. Sickerman, J. Hernández, J. Jinright, B. Hunt, Jonh, Lusk, V. Hoover, K. Armstrong, L.M. Stark, G.E. Hill & T.R. Unnasch. 2013. Risk of exposure to eastern equine encephalomyelitis virus increases with the density of northern cardinals. [En línea]. *PLOS One.* 8:2. <http://www.plosone.org/> (Consulta: 25 ene. 2014).
- Ferro, C., J. Boshell, A. Moncayo, M. González, M.L. Ahumada, W. Kang. & Weaver, S.C. 2003. Natural enzootic vectors of Venezuelan equine encephalitis virus, Magdalena Vally, Colombia. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 49-54.
- Forrester, N.L., J.L. Kenney, E. Deardorff, E. Wang, S.C. Wang & S.C. Weaver. 2008. Western equine encephalitis submergence: lack of evidence for a decline in virus virulence. *Virology.* 380: 170-172.
- Forshey, B.M., C. Guevara, V.A. Laguna-Torres, M. Céspedes, J. Vargas, A. Gianella, E. Vallejo, C. Madrid, N. Aguayo, E. Gotuzzo, V. Suárez, A.M. Morales, L. Beingolea, N. Reyes, J. Pérez, M. Negrete, & C. Rocha. 2010. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America 2000–2007. [en línea]. *plos neglected tropical diseases.* 4:8. <http://www.plosntds.org/> (Consulta: 25 ene. 2014).
- Foster, W.A. & E.D. Walker. 2002. Mosquitoes (Culicidae). p. 203-256. *In* Mullen, G. & L. Durden (eds.). *Medical and veterinary entomology.* Academic Press, California.
- Fulhorst, C.F., J.L. Hardy, B.F. Eldridge, S.B. Presser & W.C. Reeves. 1994. Natural vertical transmission of western equine encephalomyelitis virus in mosquitoes. *Science.* 263: 676-678.
- Gale, P. & N. Jonhson. 2014. The role of birds in the spread of West Nile Virus. p. 143-167. *In* Jonhson, N. (ed.). *The role of animals in emerging viral diseases.* Academic Press, California.
- Garrigues, R. & R. Dean. 2014. *The birds of Costa Rica.* 2a. ed. Zona Tropical Publication, Ithaca, Nueva York.
- Gerholdm, R.W., C. M. Tate, S.E. Gibbs, D.G. Mead, A.B. Allison & J.R. Fischer. 2007. Necropsy findings and arbovirus surveillance in mourning doves from the Southeastern United States. *J. Wild. Dis.* 43: 129–135
- González D., J.G. Estrada-Franco, A.S. Carrara, J.F. Aronson & S.C. Weaver. 2003. Equine amplification and virulence of subtype IE Venezuelan Equine Encephalitis Viruses Isolated during the 1993 and 1996 Mexican epizootics. *Emerg. infect Dis.* 9:162–168.

- Gosler, A. 2004. Birds in the hand. p. 85-118. *In* Sutherland, W.J., I. Newton & R.E. Green (eds.). *Bird Ecology and conservation: a handbook of techniques*. Oxford Biology, United Kingdom.
- Gould, E.A., B. Coutard, H. Malet, B. Morin, S. Jamal, S. Weaver, A. Gorbalenyad, G. Moureau, C. Baronti, I. Delogu, N. Forrester, M. Khasnatinov, T. Gritsun, X. de Lamballerie, & B. Cabard. 2010. Understanding the alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Research*. 87: 111–124.
- Gould, E.A. & S. Higgs. 2009. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103: 109-121.
- Hall, B.G. 2011. *Phylogenetic trees made easy*. 4. ed. Sinauer Associates, Publishers. Massachusetts, Estados Unidos.
- Haydon, D.T., S. Cleaveland, L.H. Taylor & M.K. Laurenson. 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1468-1473.
- Hayes, C.G. West Nile virus: Uganda 1937, to New York City 1999. 2001. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951: 25-37.
- Hayes, E.B., N. Komar, R.S. Nasci, S.P. Montgomery, D.R. O’Leary & G.L. Campbell. 2005. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile Virus disease. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1167-1173.
- Hollidge, B.S, F. González-Scarano & S.S. Soldan. 2010. Arboviral Encephalitides: transmission, emergence, and pathogenesis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 5:428–442.
- Hobson-Peters, J., C. Arévalo, W.Y. Chea, B.J. Blitvich, C.S Tan, A. Sandis, L.N. Araya, J.L. Hernández, P. Toyé, & R.A. Hall. 2011. Detection of antibodies to West Nile Virus in horses, Costa Rica 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11: 1081-1084.
- Howard, J.J., J. Oliver & M.A. Grayson. 2004. Antibody response of wild birds to natural infection with alphaviruses. *J. Med. Entomol.* 41: 1090-1103.
- Erdélyi, K. K. Ursu, E. Ferenczi, L. Szeredi, F. Rátz, J. Skáre & T. Bakonyi. 2007. Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile Virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7: 181-188.
- Jones, K.E., N.G. Patel, M. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J.L. Gittleman & P. Daszak. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 451: 990-993.
- Keesing, F., R.D. Holt & R.S. Ostfeld. 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters.* 9: 485–498.
- Keesing, F., Belden, L.K. Daszak, P. Dobson, A. Harvell, C.D. Holt, R.D. Hudson, P. Jolles, A. Jones, K.E. Mitchell, C.E. Myers, S.S. Bogich, T. & R.S. Ostfeld. 2010. Impacts of

- biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468: 647-652.
- Kilpatrick, A.M., L.D. Kramer, M.J. Jones, P.P. Marra & P. Dazak. 2006. West Nile Virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *PLOS Biology* 4: 606-610.
- Kilpatrick, A.M. 2011. Globalization, land use, and the invasion of West Nile Virus. *Science* 334: 323-327.
- Komar, N., S. Langevin, S. Hinten, N. Nemeth, E. Edwards, D. Hettler, B. Davis, R. Bowen & M. Bunning. 2003. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 311-322.
- Komar, N. & G.G. Clark. 2006. West Nile Virus activity in Latin América and the Caribbean. *Rev. Panam. Salud Pública.* 19:112-7.
- Kramer, L.D., L.M. Styer & G.D. Ebel. 2008. A global perspective on the epidemiology of West Nile Virus. *Annu. Rev. Entomol.* 53: 61-81.
- Kuno, G. & G.J. Chang. 2005. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their revolutionary trends. *Clinical Microbiology Review.* 18: 608- 637.
- Lanciotti, R.S., A.J. Kerst, R.S. Nasci, M.S. Godsey, C.J. Mitchell, H.M. Savage, N. Komar, N.A. Panella, B.C. Allen, K.E. Volpe, B.S. Davis & J.T. Roehrig. 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.
- Lanciotti, R.S., G.D. Ebel, V. Deubel, A.J. Kerst, S. Murri, R. Meyers, M. Bowen, N. McKinney, W.E. Morrill, M.B. Crabree, L.D. Kramer & J.T. Roehrig. 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.
- Linssen, B., R. M. Kinney, P. Aguilar, L. Russell, D. M. Watts, O. Kaaden, & M. Pfeffer. 2000. Development of reverse transcription-PCR assays specific for detection of equine encephalitis viruses development of reverse transcription-PCR assays specific for detection of equine encephalitis viruses. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1527-1535.
- Loss, S.R., G.L. Hamer, E.D. Walker, M.O. Ruiz, T.L. Goldberg, U.D. Kitron & J.D. Brawn. 2009. Avian host community structure and prevalence of West Nile Virus in Chicago, Illinois. *Oecologia* 159: 415-424.
- Loss, S.R., T. Will & P.P. Marra. 2012. The impact of free-ranging domestic cats on wildlife of the United States. *Nature communications.* 4: 1-7.
- McLean, R.G., W.J. Crans, D.F. Caccamise, J. McNeilly, L.J. Kirk, C.J. Mitchell & C.H. Calisher. 1995. Experimental infection of wading birds with eastern equine encephalitis virus. *J. Wild. Dis.* 31: 502-508.

- MacLachlan, N.J. & Dubovi E.J. (eds.). 2011. Fenner's veterinary virology. 4. ed. Academic Press, California.
- MacLachlan, N.J. & J.L. Stott. 2004. Togaviridae and Flaviviridae. p. 351-360. *In* Hirsh, D.C., N.J. MacLachlan & R.L Walker (eds.). *Veterinary microbiology*. BlackWell Publishing, Australia.
- Makino, Y., M. Tadano, M. Saito, N. Maneekarn, N. Sittisombut, V. Sirisathana, B. Poneprasert & T. Fukunaga. 1994. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. *Microbiol. Immunol.* 38: 951-955.
- Marín, R., M. C. Marquetti, Y. Álvarez, A. Gutiérrez, & R. González. 2009a. Especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) y sus sitios de cría en la Región Huetar Atlántica, Costa Rica. *Revista Biomédica* 20: 15-23.
- Marín-Rodríguez, R., M. d. C. Marquetti-Fernández, & M. Díaz-Ríos. 2009b. Índices larvales de *Aedes aegypti* antes y después de intervenciones de control en Limón, Costa Rica. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 61: 1-10.
- Marín-Rodríguez, R., & M. Díaz-Ríos. 2012a. Sitios de Cría del *Aedes aegypti* en la Región Pacífico Central de Costa Rica. *Rev. Costarr. Salud Pública.* 21: 81-86.
- Marín-Rodríguez, R., M. Díaz-Ríos, & Y. Álvarez-Gutiérrez. 2012b. Sitios de Cría del *Aedes aegypti* en la Provincia de Limón, Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública* 21: 15-18.
- Marín-Rodríguez, R., M. Díaz-Ríos, & Y. Álvarez-Gutiérrez. 2013. *Aedes albopictus* y sus sitios de cría en la provincia de Limón, Costa Rica. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 65: 320-328.
- Marra, P., S. Griffing, C. Caffrey, A.M. Kilpatrick, R. McLean, C. Brand, E. Saito, A.P. Dupuis, L. Kramer & R. Novak. 2004. West Nile Virus and wildlife. *BioScience* 54: 393-402.
- Martín, D.H., G.A. Eddy, W.D. Sudia, W.C. Reeves, V.F. Newhouse, & K.M. Johnson. 1972. ~~En~~ Epidemiological study of Venezuelan Equine Encephalomyelitis in Costa Rica, 1970. *Am. J. Epidemiol.* 95: 565-578.
- Matlock Jr., R.B, D. Rogers, P.J. Edwards & S.P. Marin. 2002. Avian communities in forest fragments and reforestation areas associated with banana plantations in Costa Rica. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 91: 199-215.
- May, F.J., C.T. Davis, R.B. Tesh & A.D.T. Barret. 2011. Phylogeography of West Nile Virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J. Virol.* 85: 2964-2974.
- Méndez, F., M. Barreto, J.F. Arias, G. Rengifo, J. Muñoz, M.E. Burbano & B. Parra. 2006. Human and Mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 678-683

- Molaei, G., T.G. Andreadis, P.M. Armstrong, M.C. Thomas, T. Deschamps, E. Cuebas-Incle, W. Montgomery, M. Osborne, S. Smole, P. Matton, W. Andrews, C. Best, F. Cornine III, E. Bidlack & T. Teixeira. 2013. Vector-host interactions and epizootiology of eastern equine encephalitis virus in massachusetts. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 13: 312-323.
- Morales-Betoulle, M.E., N. Komar, N.A. Panella, D. Álvarez, M.R. López, J. Betoulle, S.M. Sosa, M.L. Muller, A.M. Kilpatrick, R.S. Lanciotti & B.W. Jonhson. 2013. West Nile Virus ecology in a tropical ecosystem in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88: 116–126.
- Morrison, A.C., B.M Forshey, D. Notyce, H. Astete, V. Lopez, C. Rocha, R. Carrion, C. Pesko, K.N & G.D. Ebel. 2012. West Nile virus population genetics and evolution. *Infection Genetics and Evolution*. 12: 181-190.
- Moudy, R.M., M.A, Meola, L.L. Morin, G.D. Ebel, & L.D. Kramer. 2007. A newly emergent genotype of West Nile Virus is transmitted earlier and more efficiently by culex mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77: 365-370.
- Nemeth, N., D. Gould, R. Bowen & N. Komar. 2006. Natural and experimental West Nile Virus Infection in five raptor species. *J. Wild. Dis.* 42: 1-13.
- Nemeth,N., G. Young, C. Ndaluka, H. Bielefeldt-Ohmann, N. Komar & R. Bowen. 2009. Persisten West Nile infection in the House Sparrow (*Passer domesticus*). *Arch Virol.* 154: 783-789.
- Naomi, L.F., J.L. Kenney, E. Deardorff, E. Wang & S.C. Weaver. 2008. Western Equine Encephalitis submergence: lack of evidence for a decline in virus virulence. *Virology*. 380: 170-172
- NABC (North American Banding Council). 2001. The North American bander's study guide. 1a. ed. NABC, Point Reyes, California.
- Oberste, M.S., S.M. Schmura, S.C. Weaver & J.F. Smith. 1999. Geographic distribution of Venezuelan Equine Encephalitis Virus subtype IE Genotypes in Central América and Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 630-634.
- Ostfeld, R.S. & F. Keesing. 2000. The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can. J. Zool.* 78: 2061-2078.
- Ostfeld, R.S. & F. Keesing. 2012. Effects of host diversity on infectious disease. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43: 157–82.
- Quiroz, E., P.V. Aguilar, J. Cisneros, R.B. Tesh, S.C. Weaver. 2009. Venezuelan equine encephalitis in Panama: fatal endemic disease and genetic diversity of etiologic viral strains. [En línea]. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 3:6. <http://www.plosntds.org/> (Consulta: 25 ene. 2014).

- Paddock, C.D., W.L. Nicholson, J. Bhatnagar, C.S. Goldsmith, P.W. Greer, E.B. Hayes, J.A. Risko, C. Hemderson, C.G. Blackmore, R.S. Lanciotti, G.L. Campbell & S.R. Zaki. 2006. Fatal hemorrhagic fever caused by West Nile Virus in the United States. *CID*. 42: 1527–1535.
- Pesko, K. & G. Ebel. 2012. West Nile Virus population genetics and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*. 12: 181-190.
- Pollock, C.G. 2008. West Nile Virus in the Americas. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 22: 151-157
- Rappole, J.H., S.R. Derrickson & Z. Hubalek. 2000. Migratory birds and spread of West Nile Virus in the western hemisphere. *Emerg. Infect. Dis.* 6: 319-328.
- Reisen, W.K. 2010. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 461-483.
- Reisen, W.K., Y. Fang, H.D. Lothrop, V.M. Martinez, J. Wilson, P. O'Connor, R. Carney, B. Cahoon-Young, M. Shafii & A.C. Brault. 2006. Overwintering of West Nile Virus in Southern California. *J. Med. Entomol.* 43: 344-355.
- Saito, E.K., L. Sileo, D.E. Green, C.U. Meteyer, G.S. McLaughlin, K.A. Converse & D.E. Docherty. 2007. Raptor mortality due to West Nile Virus in the United States 2002. *J. Wild. Dis.* 43: 206-213.
- Sandoval, L. & J.E. Sánchez. 2013. Lista de aves de Costa Rica, décima tercera actualización [en línea]. 13. ed. Unión de Ornítólogos de Costa Rica, Costa Rica. <http://uniondeornitologos.com/wp-content/uploads/2013/06/Lista-de-Aves-de-Costa-Rica-11-Abril-2013.pdf> (Consulta: 4 ago. 2013).
- SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal). 2009a. Encefalomiелitis Equina [en línea]. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/> (Consulta: 9 feb. 2014).
- SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal). 2009b. Encefalomiелitis Equina Venezolana. [En línea]. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/> (Consulta: 9 feb. 2014).
- SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal). 2013a. Informe sobre un caso de Encefalitis Equina del Este en la Región Huetar Atlántica [en línea]. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/> (Consulta: 9 feb. 2014).
- SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal). 2013b. Informe sobre caso confirmado de Fiebre del Nilo Occidental en la Región Chorotega [En línea]. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/> (Consulta: 9 feb. 2014).
- SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal). 2013c. Informe sobre un caso confirmado del Virus del Oeste del Nilo en un emu en la región Pacífico Central. [En línea]. Ministerio

- de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/> (Consulta: 9 feb. 2014).
- SINAC (Sistema Nacional de Áreas de Conservación). 2015. Áreas de Conservación. [En línea]. <http://www.sinac.go.cr/AC/ACOPAC/PNCarara/Paginas/default.aspx>. (Consulta: 28 feb. 2015).
- Shope, R. & J.P. Woodall. 1973. Ecological interaction of wildlife, man, and a virus of the Venezuelan equine encephalitis complex in a tropical forest. *J. Wild. Dis.* 9: 198- 203.
- Sibley, D.A. 2000. *The Sibley guide to birds*. Knopf, New York.
- Smith, K.F., D.F. Sax & K.D. Lafferty. 2006. Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conservation Biology*. 20: 1349-1357.
- Stiles, G. & A.F. Skutch. 2007. *Guía de aves de Costa Rica*. 4. ed. INBio, Costa Rica.
- Stout, W.E., A.G. Cassini, J.K. Meece, J.M. Papp, R.N. Rosenfield & K.D. Reed. 2005. Serologic evidence of West Nile Infection in three wild raptor populations. *Avian. Dis.* 49: 371-375.
- Veazey, R. S., C. C. Vice, D.Y. Cho, T.N. Tully & S.M. Shan. 1994. Pathology of eastern equine encephalitis in emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet. Pathol.* 31: 109-111.
- Van der Kelen, P.T., J.A. Downs, L.M. Stark, R.W. Loraamm, J.H. Anderson & T.R. Unnasch. 2012. Spatial epidemiology of eastern equine encephalitis in Florida [En línea] *International Journal of Health Geographich.* 11:47.<http://www.ij-healthgeographics.com/> (Consulta: 25 ene. 2014).
- Weidong, G., T.R. Unnasch, C.R. Katholi, R. Lampman & R.J. Novak. 2008. Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102: 817- 822.
- Weaver, S. C., W. Kang, Y. Shirako, R. Rumenapf, E.G. Strauss, & J.H. Strauss. 1997. Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *J. Virol.* 71: 613–623.
- Weaver, S.C., M. Pfeffer, K. Marriott, W. Kang & R.M. Kinney. 1999. Genetic evidence for the origins of Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60: 441–448.
- Weaver, S.C., C. Ferro, R. Barrera, J. Boshell & J.C. Navarro. 2004. Venezuelan equine encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.* 49:141–74.
- Wheeler, S.S., M.P. Vineyard, L.W. Woods & W.K. Reisen. 2012a. Dynamics of West Nile Virus persistence in house sparrows (*Passer domesticus*). [En línea]. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2:12. <http://www.plosntds.org/> (Consulta: 1 mar. 2014).

- Wheeler, S.S., S.A. Langevin, A.C. Brault, L. Woods, B.D. Carroll & W.K. Reisen. 2012b. Detection of persistent West Nile Virus RNA in experimentally and naturally infected avian host. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87: 559-564.
- White, L.A. 1987. Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 cells to viral infection. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1221-1224.
- Williams, J.E., O.P. Young, D.M. Watts & T.M. Reed. 1971. Wild birds as Eastern (EEE) and Western (WEE) Equine Encephalitis sentinels. *J. Wild. Dis.* 7: 188-194.
- Zacks, M.A. & S. Paessler. 2010. Encephalitic alphaviruses. *Veterinary Microbiology.* 140: 281-286.