

Apuntes para el desarrollo de sistemas de vigilancia para la detección precoz del Virus del Oeste del Nilo

Luis Alfonso Díaz Martínez*
Flor de María Cáceres Manrique**
Gerardo Muñoz***

Resumen

A finales de 1999 se presentaron en los Estados Unidos los primeros casos humanos producidos por el virus del Oeste del Nilo, el cual circulaba tan solo en el norte de África, Oriente Medio, el Cáucaso, los Balcanes y la cuenca Mediterránea. Luego de su aparición se ha extendido en dos años a la mitad occidental de los Estados Unidos, Canadá y algunas islas del Caribe, por lo se espera se disemine por

todo el continente ya que su principal reservorio son las aves, incluyendo las migratorias. En este artículo se revisan los elementos fundamentales que se han descubierto de esta nueva epidemia, así como las recomendaciones actuales sobre sistemas de vigilancia del virus. **Palabras clave:** Virus del oeste del Nilo, encefalitis, vigilancia en salud pública. 🌐

Infectio 2002; 6(4): 226-234

Introducción

A finales del otoño de 1999 se presentaron en los Estados Unidos los primeros casos humanos de encefalitis producida por el virus del Oeste del Nilo (WNV, por sus siglas en inglés) (1, 2). Con el descubrimiento de mosquitos transinvernales infectados con el virus durante el invierno 1999-2000, se logró predecir el reinicio de la actividad viral en la siguiente primavera (3,4), con lo cual se emprendieron en forma precoz estrategias de vigilancia de la enfermedad y control de vectores en la ciudad de Nueva York y sus alrededores (5).

Los esfuerzos de vigilancia se enfocaron a identificar y documentar infecciones por el WNV en las aves, mosquitos y equinos utilizados como animales centinelas que pudieran predecir la ocurrencia de enfermedad en humanos (6, 7). Al final de la estación de transmisión de enfermedades

trasmitidas por vectores (ETV) del 2000, se había identificado actividad del WNV en un área de 12 estados de la costa atlántica (8, 9). Durante ese año se informaron 21 casos en humanos, 63 en caballos, 4304 aves (78 especies afectadas) y 480 grupos ("pools") de mosquitos de 14 especies diferentes.(10-12). Para el 2001 la actividad se extendió dramáticamente a un total de 28 estados, Canadá y las Islas Caimán, con 66 casos humanos (14% letales), 733 equinos (65.9% en La Florida), 7333 aves muertas de 73 especies distintas (70.3% córvidos) y 27 especies de mosquito involucradas en la transmisión del WNV (59% *Culex pipiens* y *Culex restuans*)(13). Esta incidencia anual hizo que el WNV se convirtiera en la segunda causa de encefalitis viral humana en los Estados Unidos, siendo superada sólo por el virus de la encefalitis de LaCrosse

* Médico especialista en pediatría y en epidemiología; Profesor Asociado, Facultad de medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga. Actualmente estudiante de la maestría en epidemiología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

** Enfermera especialista en epidemiología y en docencia universitaria; Unidad de Epidemiología, ESE Hospital Universitario Ramón González Valencia. Actualmente estudiante de la maestría en epidemiología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

*** Bacteriólogo, candidato a PhD, London Tropical Medicine and Hygiene School; Profesor Asociado, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Correspondencia: Dr. Díaz, Calle 13 # 29-21, Bucaramanga, Colombia; e-mail: ladimar@hotmail.com

(14), con una seroprevalencia en población general de Nueva York luego de la epidemia de 1999 de 2.6% (15).

Aspectos clave en la epidemiología del Virus del Oeste del Nilo

El virus del Oeste del Nilo es un miembro de la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*; serológicamente forma parte del complejo del virus de la encefalitis japonesa, que incluye los virus de la encefalitis de San Luis, de Kunjin y del valle Murray, entre otros (16-19). El WNV fue aislado en la provincia ugandesa del Oeste del Nilo en 1937 (20), pero las primeras epidemias registradas se dieron en Israel durante 1951-1954 y 1957, para reaparecer allí en el 2000 (21-23). La epidemia más grande registrada ocurrió en Sudáfrica en 1974 (24), habiendo ocurrido otras epidemias en el sur de Francia (1962) (25), el sureste de Rumania (1960 y 1996) (26-28) y en la región centro-sur de Rusia (1999) (29-31); también se han presentado epizootias equinas en Italia (1998) y Francia (2000) (32).

Aunque no se conoce cómo o cuándo llegó el WNV a Norteamérica, se presumen varias posibilidades, como viajeros internacionales infectados, importación de aves o mosquitos infectados, o migración de éstas (33, 34). Este virus puede infectar una gran cantidad de vertebrados (35); en los humanos por lo general produce tanto infecciones asintomáticas o una enfermedad febril leve, algunas veces acompañada de eritema, pero puede causar enfermedad grave o letal en un pequeño porcentaje de pacientes. Entre los pacientes detectados en Nueva York durante 1999, aproximadamente el 40% de quienes sufrieron encefalitis o meningitis confirmada por laboratorio tenían debilidad muscular, mientras que otro 10% desarrollaron parálisis flácida aguda con hallazgos electromiográficos consistentes con neuropatía axonal (36, 37); la letalidad estuvo cerca al 11% (38, 39), con casos ocasionales de secuelas neurológicas graves (40). Para el 2001, el 97% de los pacientes presentaron cuadros de infección del sistema nervioso central (9-11, 13).

Al contrario de lo que ocurre en los lugares donde históricamente se presentaba la actividad del WNV, en los Estados Unidos se presentó como punto clave para detectar la epidemia la muerte de una gran cantidad de distintas especies de aves (41-43). No se sabe la razón de esto, pero los responsables de salud pública han sido capaces de utilizar la

mortalidad aviaria, particularmente de los miembros de la familia *Corvidae*, como señal efectiva de la expansión del WNV por el país (9-11, 13, 44-45).

Los estudios de campo iniciales determinaron que en las áreas en donde se presenta mortalidad aviaria por infección con WNV, son aquellas en las que posteriormente se da transmisión enzoótica; sin embargo, gran cantidad de las aves que se infectan sobreviven, tal como lo indica la alta seroprevalencia en numerosas especies de aves residentes en las regiones con gran transmisión viral (9-11, 13, 46). En la actualidad no se conoce en que grado las aves migratorias pueden contribuir de forma natural a los ciclos silvestres de transmisión y a la dispersión del virus, pero muchas de las especies de aves infectadas migran hacia el sur, llegando hasta Sudamérica (47); esto es preocupante ya que el papel de las aves migratorias se ha demostrado como la causa de la reaparición del WNV en Israel (48, 49).

Por otra parte, el WNV en los Estados Unidos es transmitido básicamente por mosquitos de la especie *Culex* (50), aunque a finales del 2001 se han identificado 27 especies de mosquitos infectadas (9-11, 13). Muchas especies se alimentan de diversos mamíferos y aves durante el día y la noche, por lo que no es posible tener una visión amplia de la ecología del virus (51), sobre todo si se tiene en cuenta que para la infección con VNW no se requiere siempre como vector una especie de mosquito del todo competente (52-55).

Es poco el adelanto que se ha logrado en cuanto a vacunas o tratamiento. En el primer caso se vislumbran vacunas contra el DNA del WNV (56) o derivados quiméricos de la vacuna de fiebre amarilla (57), pero no se vislumbra antes de cinco años la existencia de una vacuna efectiva contra el virus (58). En el segundo, solo hay reportes aislados del uso de inmunoglobulina intravenosa (59, 60), con apenas los primeros estudios in vitro del efecto de antivirales contra el virus, sin que exista una terapia específica contra el virus (61). Esto orienta a que es la respuesta de control de vectores la única estrategia que por ahora se considera como potencialmente útil (62).

Una vez se detectó la epidemia, y dado su impacto, se desarrollaron en Estados Unidos varias medidas de vigilancia y control, la mayoría por iniciativa local (63-66), que desembocaron en un plan nacional intersectorial orientado a estandarizar las estrategias de vigilancia y a coordinar las actividades de prevención y control, tanto en el ámbito internacional como nacional, estatal y local (67-70).

Una inquietante posibilidad es que el WNV se disemine vía las aves migratorias que se han encontrado infectadas, muchas de las cuales pueden llegar o pasar por Colombia (47), lo que dado la existencia de muchos municipios con índices vectoriales elevados que podrían permitir en un futuro cercano un brote epidémico de gran extensión (71), razón por la cual es necesario anticipar su aparición y fortalecer las medidas de respuesta en caso de que el virus aparezca, particularmente con los cambios ecológicos que se presentan en la actualidad (72).

Estrategias para la vigilancia del Virus del Oeste del Nilo

La vigilancia epidemiológica del WNV se puede hacer desde dos perspectivas, vigilancia ecológica y vigilancia de casos humanos, a partir de las cuales se pueden plantear en momentos diferentes, según necesidad, cuatro estrategias de vigilancia.

Mortalidad aviaria

Se ha demostrado que la vigilancia de la morbilidad y mortalidad de las aves es la estrategia más sensible para detectar precozmente la actividad del WNV; por lo general precede la presencia de casos en humanos. Esta incluye al menos dos componentes: reporte y análisis oportuno de la mortalidad aviaria y análisis de la presencia del virus en las aves afectadas (73).

Se recomienda establecer un sistema permanente de inspección en zonas determinadas en búsqueda de aves muertas. Las zonas donde más fácilmente esto se puede realizar son aquellas fáciles de recorrer y con abundante número de aves, como parques y similares u otras zonas abiertas como las riveras y zonas de reserva forestal. Toda ave que se detecte muerta debe ser notificada con la información referente a sitio del hallazgo (con la mayor resolución posible), fecha y circunstancias en que se encontraba el cadáver (74).

Las aves en buena condición (sin signos obvios de descomposición o muy destrozados por efecto de depredadores, carroñeros o gusanos) han de ser enviados para pruebas de laboratorio. Todos los especímenes deben ser manipulados cuidadosamente, evitando el contacto directo con la piel (75). En general se han de incluir todo tipo de aves, pero dada la experiencia en EU se debe hacer énfasis en los córvidos (9, 11, 13, 76). En Colombia se han documentado 1865 especies de aves, siete de las

cuales son córvidos: urraca collareja (*Cyanolyca armillata*), urraca turquesa (*Cyanolyca turcosa*), urraca del Chocó (*Cyanolyca pulcra*), carraquí violáceo (*Cyanocorax violaceus*), carraquí pechinegro (*Cyanocorax heilprini*), carraquí pechiblanco (*Cyanocorax affinis*) y carraquí pechiamarillo (*Cyanocorax yncas*) (77, 78).

Para detección del virus sólo se requiere una muestra de cualquier órgano, siendo preferible muestras de riñón, corazón o cerebro. Las pruebas que se pueden realizar son de aislamiento viral o de detección del RNA por medio de PCR-RT, las cuales por lo general son positivas luego de una a dos semanas de la transmisión al ave afectada (79).

La gran mayoría de las aves muertas por WNV halladas en descampado no se presentan en episodios masivos, excepto quizás a principio de la epidemia en Nueva York en donde se vieron afectadas las aves del zoológico del Bronx, por lo que no hay que esperar que esto ocurra nuevamente (80). Por otro lado, aunque muchas de las aves muertas que se pueden detectar a campo abierto pudieron ser víctimas de depredadores, también es cierto que hasta la tercera parte de las aves que mueren por el WNV son ingeridas por carroñeros, por lo que se debe captar y analizar todas las aves detectadas, más si se tiene en cuenta que no hay ningún hallazgo característico de esta infección entre las aves afectadas (81).

Animales centinela

La vigilancia por medio de aves vivas ha sido una estrategia tradicional en la vigilancia de arbovirus (82). En este sentido hay dos estrategias, una consistente en la monitorización de aves cautivas, particularmente aves de corral, gansos y palomas (83, 84), y otras la captura y estudio de aves libres (69). En ambos casos se hacen pruebas serológicas, las cuales por lo general se positivizan luego de tres semanas de ocurrida la infección (6).

Los sitios donde han de mantenerse las aves centinela deben ser ubicados cerca de los focos probables de transmisión enzoótica y dejarlas de tal forma que los vectores puedan alimentarse de ellas. Aunque no existe un modelo ideal de vigilancia centinela para WNV con aves cautivas, las especies a utilizar deben cumplir los siguientes criterios:

1. Ser universalmente susceptibles a la infección
2. Tener una sobrevida del 100% a la infección, así como desarrollar anticuerpos fácilmente detectables.

3. No implicar riesgo de infección para los cuidadores y manipuladores
4. No desarrollar viremia que permita la infección de nuevos vectores

En todo caso, la sangre ha de recolectarse semanalmente en microcontenedores o centrifugados para obtener suero. Este debe probarse ya sea por medio de inhibición de la hemaglutinación, ELISA o de neutralización en placa, debiéndose confirmar las pruebas positivas para evitar falsos positivos producto de reacción cruzada con otros Flavivirus. Hay que tener en cuenta que el proceso para obtener el suero o procesar las muestras es diferente al empleado en humanos (85).

Desde el punto de la experiencia de la vigilancia del WNV en EU con aves centinela cautivas, ésta no ha sido tan efectiva como se esperaba, aunque estudios de campo encontraron que tanto la gallinas y palomas cautivas al momento de la epidemia de 1999 y luego en el esfuerzo del 2000 estaban con frecuencia infectadas; incluso, se atribuyó cierta proporción de la mortalidad presente en gallinas de la agroindustria al WNV (69). Por otro lado, en el 2001 en cuatro condados de La Florida en los que se presentaron casos humanos, la seroconversión de las aves centinela fue el primer signo de actividad del WNV (9, 11, 13).

Por otro lado, la serovigilancia de las aves libres es una oportunidad para tomar muestras de las especies que pueden actuar como reservorio, lo cual es útil tanto como estrategia para monitorizar la actividad del WNV como mecanismo de detección precoz de la presencia del mismo. Las mejores especies para serovigilancia son aquellas en las que la infección no es mortal y su velocidad de reemplazo es alto, lo que permite asegurar una relativamente baja proporción de individuos afectados (86).

El uso de aves libres plantea retos que en el caso de la serovigilancia con aves cautivas no se presenta. Para la mayoría de especies no existen técnicas que permitan detectar Ig M, indicador de infección reciente, debiéndose utilizar la más dispendiosa técnica de inhibición en placa; no puede documentarse el mecanismo por el cual al ave se infecta; una prueba positiva en un ave de más de un año puede indicar infección antigua más que seroconversión reciente, mucho más difícil de medir si no se tienen pruebas pareadas, mientras que una prueba positiva en un ave muy joven, de menos de un mes, puede indicar transmisión materna de

anticuerpos (87-89). Con todo, durante la epidemia urbana en Nueva York en 1999-2000 varias especies comunes de aves (gorriones, cardenales, palomas) tenían una elevada seroprevalencia. De hecho, en la zona noreste de Queens con alta seroprevalencia aviaria pero sin casos humanos en 1999, en el 2000 se presentaron casos entre los residentes de la zona (69).

La vigilancia de la actividad del WNV en los equinos es importante dado que estos animales pueden ser centinelas de la actividad enzoótica del virus, a más que su salud es importante desde el punto de vista económico, aunque no es el único animal doméstico o peridomiciliario que puede verse afectado por el WNV (86, 90). Un inquietante aspecto que se ha demostrado experimentalmente es el papel potencial de los equinos como amplificadores de la infección, aunque faltan evidencias empíricas que documenten que esto así ocurre (91, 92).

Este tipo de vigilancia consiste en la monitorización periódica del suero de los equinos en búsqueda de seroconversión, así como el estudio de especímenes patológicos, especialmente cerebro y medula espinal) para patología (macro y micro), PCR, aislamiento viral e inmunohistoquímica (86).

Vigilancia entomológica

La velocidad de transmisión del virus en aves sobrepasa ampliamente la de su dispersión entre mamíferos incluido el humano, lo que presupone una eficiencia vectorial diferencial entre mosquitos según su hospedero. De hecho, en focos de la enfermedad en Estados Unidos se ha incriminado a *Culex melanura* en la circulación del virus en aves silvestres, mientras que en humanos o caballos el vector es *Culex salinarius* (50).

La vigilancia entomológica de la población de mosquitos de un área a riesgo debe incluir la composición y dinámica poblacional de especies, pero hacer énfasis en responder ciertas incógnitas de componentes fisiológicos, tales como preferencia de hospedero, actividad de picadura, comportamiento de oviposición, etc. El mecanismo para lograr depurar la información sobre las especies y efectuar la vigilancia adecuada, se basa en dos estrategias que pueden ser simples y económicas si se ejecutan multisectorialmente: vigilancia de larvas y de adultos (82).

Para la primera todo el equipo requerido es un cucharón, vasos desechables, claves dicotómicas, estereomicroscopio y el cumplimiento estricto de un cronograma de trabajo. Los depósitos que pueden servir de criaderos son diversos en tamaños, ser

naturales o hechos por el hombre, contener agua limpia, putrefacta u orgánica (rica en algas) como la utilizada por *Culex* y pueden ser afectados por las precipitaciones pluviales. La vigilancia de larvas debe servir para: i) conocer los tipos de criaderos de las especies vectores en aves, caballos y humanos principalmente, ii) monitorear la dinámica poblacional con y sin medidas de control vectorial y iii) focalizar las estrategias de control en criaderos productivos e expensas de aquellos ocasionales (82).

Para la vigilancia en adultos se requiere de trampas que usen como cebos aves silvestres, caballos y humanos, ovitrampas con aguas de calidad diversa y capturadores manuales o mecánicos para coleccionar en sitios de reposo (82). Una muestra representativa de los adultos debe servir para la vigilancia periódica de la infección viral, la cual se puede hacer mediante RT-PCR (79) o en inoculaciones en cerebro de ratón lactante (50). Su objetivo es establecer la proporción de infección de mosquitos a fin de estimar el riesgo que la población humana tiene; igualmente permite identificar áreas de riesgo, evaluar la necesidad de intervenciones de control de vectores, monitorizar las medidas emprendidas y entender mejor los ciclos de transmisión, así como la dinámica de los vectores (5).

La vigilancia implica el desarrollo de una red de trampas cercanas a los potenciales sitios de transmisión, hecho que puede definirse si se presentan casos humanos o hay muertes confirmadas por WNV entre aves. Igualmente hay que buscar los criaderos de los mosquitos para determinar la especie existentes, de tal forma que entre los datos obtenidos de larvas y adultos sea posible establecer su diversidad en el hábitat, su abundancia, la proximidad que tengan respecto a los centros habitacionales o recreacionales y el rango de vuelo de los vectores (82).

Vigilancia de casos humanos

El objetivo primario de los sistemas de vigilancia epidemiológica es la prevención de la infección y enfermedad en humanos. En caso de que la actividad arboviral sea improbable o los recursos para desarrollar sistemas de vigilancia entomológica o basada en aves sean escasos, los sistemas que se fundamentan en la detección de casos humanos se convierten en las principales, incluso únicas, fuentes de información de la actividad del WNV (89).

En el norte Estados Unidos la mayoría de casos humanos se dan durante agosto y septiembre, relacionado con la época de mosquitos y el impacto

que sobre estos tiene la disminución de la temperatura (93), y justo después de la epizootia en aves y antes del ascenso de la seroprevalencia en equinos; en cambio en La Florida la transmisión ocurre durante todo el año, tal como podría darse en los trópicos, donde las estaciones no interrumpen la actividad vectorial (94).

La mayoría de los casos humanos de WNV presentan encefalitis de origen inicialmente desconocido, asociados hasta en un 33% con debilidad muscular generalizada; algunos casos inicialmente se presentaron como meningitis aséptica o síndrome de Guillain-Barré sin compromiso encefálico. Igualmente, la mayoría de los casos eran adultos mayores y ancianos, con ocasionales casos entre los menores de 20 años (95, 96).

La mejor forma para confirmar el diagnóstico es la detección de anticuerpos específicos tipo Ig M en muestras de suero o líquido cefalorraquídeo (LCR) tomadas en los primeros ocho días de la enfermedad (97). Estudios longitudinales han mostrado que estos anticuerpos persisten por 12 meses o más, por lo que su detección no necesariamente indica una infección aguda por WNV (98). Una alternativa es la detección de partículas virales en muestras de LCR, pero su sensibilidad ha sido de tan solo 57%, por lo que esta prueba no mejora la capacidad de las relativamente poco técnicas de detección de anticuerpos específicos (33, 79, 99).

En general, la monitorización de casos de encefalitis es el evento prioritario a vigilar; otros eventos que podrían incluirse son enfermedades como meningitis o meningoencefalitis aséptica, botulismo y síndrome de Guillain-Barré (100). En todo caso, los sistemas de vigilancia pueden ser del tipo pasivo, activo o por proyectos especiales.

La vigilancia pasiva es la mejor alternativa cuando se conoce que no hay actividad del WNV en una región. Esta se fundamenta en estudiar al menos los pacientes hospitalizados con diagnóstico de encefalitis de etiología desconocida junto con los pacientes de las otras enfermedades compatibles (101). En todo caso, se requiere un alto grado de sospecha del cuadro de encefalitis, luego de lo cual han de realizarse las pruebas de laboratorio pertinentes para confirmar el diagnóstico; es importante tener muestras pareadas tanto de la fase aguda como el período convaleciente para asegurar una correcta interpretación de los resultados (102).

Cuando se conoce que hay actividad del WNV la vigilancia activa es la mejor alternativa. En general,

se pueden plantear desde dos enfoques, los cuales no son mutuamente excluyentes. El primero consiste en contactar los médicos que podrían atender los pacientes con infección por WNV (infectólogos, neurólogos, intensivistas), así como a los responsables institucionales del control de infecciones, a fin de mantener con ellos un contacto periódico para preguntarles acerca de casos potenciales (103). El segundo, es desarrollar un sistema de vigilancia con base en los laboratorios que procesan LCR en búsqueda de especímenes que cumplan ciertos criterios de infección arboviral (pleocitosis leve o moderada mas pruebas negativas para bacterias, hongos, herpesvirus y enterovirus), a fin de probarlos para infección por WNV (104).

Finalmente, se pueden desarrollar ciertos proyectos especiales que permiten fortalecer por corto tiempo la vigilancia de enfermedades por arbovirus. Ejemplo de ello es el sistema de vigilancia de todos los casos humanos de fiebre con linfadenopatía o rash, en quienes se estudia la presencia del virus; esta alternativa puede

ser útil a la hora de establecer si en una región existe o no actividad viral (89). 🌐

Abstract

At the end of 1999 it was reported in the United States the first human cases of infection with the West Nile Virus, which had been described only in the north of África, Half East, the Caucasus, the Balkans and the Mediterranean basin. After their appearance it has extended in two years to the half western of the United States, Canada and some islands of the Caribbean, for this reason exists the possibility of its dissemination to the whole continent. Its main hosts are the birds, including the migratory ones. In this article the fundamental elements of this new epidemic are revised, as well as the current recommendations on systems of surveillance of the virus. **Key words:** west nile virus, encephalitis, public health surveillance.

Referencias

- Centers for Disease Control and Prevention.** Outbreak of West Nile-like viral encephalitis – New York, 1999. *MMWR* 1999; 48(38): 845-9.
- Hochberg LR, Sims JR, Davis BT.** West Nile encephalitis in Massachusetts. *N Eng J Med* 2002; 346(13): 1030-1.
- Centers for Disease Control and Prevention.** Update: Surveillance for West Nile virus in overwintering mosquitoes – New York, 2000. *MMWR* 2000; 49(9):178-9.
- Petersen LR, Roehrig JT.** West Nile virus: A reemerging global problem. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4):611-4.
- Nasci RS, Savage HM, White DJ, et al.** West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4):742-4.
- Cherry B, Trock SC, Glaser A, et al.** Sentinel chickens as a surveillance tool for West Nile virus in New York City, 2000. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951:343-6.
- Cannon CE, Pavlin JA, Vaeth MF, et al.** Department of Defense West Nile virus surveillance. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951:340-2.
- Marfin AA, Petersen LR, Eidson M, et al.** Widespread West Nile virus activity, Eastern United States, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4):730-5.
- Centers for Disease Control and Prevention.** West Nile virus activity – New York and New Jersey, 2000. *MMWR* 2000; 49(28):640-2.
- Centers for Disease Control and Prevention.** Update: West Nile virus activity – Northeastern United States, January-August 7, 2000. *MMWR* 2000; 49(31):714-7.
- Centers for Disease Control and Prevention.** West Nile virus activity – Eastern United States, 2001. *MMWR* 2001; 50(29):617-9.
- McCarthy TA, Hadler JL, Julian K, et al.** West Nile virus serosurvey and assessment of personal prevention efforts in an area with intense epizootic activity: Connecticut, 2000. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 307-16.
- Centers for Disease Control and Prevention.** West Nile virus activity – United States, 2001. *MMWR* 2002; 51(23): 497-501.
- Anderson JF, Vossbrinck CR, Andreadis TG, Iton A, Beckwith WH, Mayo DR.** A phylogenetic approach to following West Nile virus in Connecticut. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 98(23):12885-9.
- Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, et al.** Epidemic West Nile encephalitis, New York 1999: Results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet* 2001; 358:261-4.
- American Committee on Arthropod-borne Virus, Subcommittee on InterRelationships Among Catalogued Arbovirus.** Identification of arbovirus and certain rodent-borne viruses: Reevaluation of the paradigm. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4):756-8.
- Scherret JH, Poidinger M, Mackenzie JS, et al.** The relationships between West Nile and Kunjin viruses. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4):697-705.
- Briese T, Jia XY, Huang C, Grady LJ, Lipkin WI.** Identification of a Kunjin/West Nile flavivirus pattern in brains of patients with New York encephalitis. *Lancet* 1999; 354:1261-2.
- Jia XY, Briese T, Jordan I, et al.** Genetic analysis of

- West Nile New York 1999 encephalitis virus. *Lancet* 1999; 354: 1971-2.
20. **Tomori O, Fagbami A, Fabiyi A.** Isolations of West Nile virus from man in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; 72(1):103-4.
 21. **Weinberg M, Pitlik SD, Gandacu D, et al.** West Nile fever outbreak, Israel, 2000. Epidemiological aspects. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 686-91.
 22. **Giladi M, Metzkor-Cotter E, Martin DA, et al.** West Nile encephalitis in Israel, 1999: The New York Connection. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4):659-61.
 23. **Hindiyeh M, Shulman LM, Mendelson E, Weiss L, Grossman Z, Bin H.** Isolation and characterization of West Nile virus from the blood of viremic patients during the 2000 outbreak in Israel. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4):748-50.
 24. **Jupp PG.** The ecology of West Nile virus in South Africa and the occurrence of outbreaks in humans. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951:143-52.
 25. **Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG.** West Nile in the mediterranean basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 117-26.
 26. **Han LL, Popovici F, Alexander JP, et al.** Risk factors for West Nile virus infection and meningoencephalitis, Romania, 1996. *J Infect Dis* 1999; 179: 230-3.
 27. **Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, et al.** West Nile encephalitis epidemic in Southeastern Romania. *Lancet* 1998; 352:767-71.
 28. **Campbell GL, Ceianu CS, Savage HM.** Epidemic West Nile encephalitis in Romania. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951:94-101.
 29. **L'vov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, et al.** Isolation of two strain of West Nile virus during an outbreak in Southern Russia, 1999. *Emerg Infect Dis* 2000; 6(4):373-6.
 30. **Platanov AE.** West Nile encephalitis in Russia 1999-2000. Were we ready? Are we ready? *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951:102-16.
 31. **Platanov AE, Shipulin GA, Shipiluna OY, et al.** Outbreak of West Nile infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:128-32.
 32. **Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H.** West Nile outbreak in horses in Southern France, 2000: The return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4):692-6.
 33. **Lanciotti RS, Roehring JT, Debubel V, et al.** Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. *Science* 1999; 268:2333-7.
 34. **Enserink M.** New York's lethal virus came from Middle East, DNA suggests. *Science* 1999; 286:1450-1.
 35. **McLean RG, Ubico SR, Docherty DE, Hansen WR, Sileo L, McNamara TS.** West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951:54-7.
 36. **Weiss D, Carr D, Kellachan J, et al.** Clinical findings of West Nile virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4):654-8.
 37. **Asnis DS, Conetta R, Teixeira AA, Waldman G, Sampson BA.** The West Nile outbreak of 1999 in New York: The Flushing Hospital experience. *Clin Infect Dis* 2000; 30(3): 413-8.
 38. **Sampson BA, Armbrustmacher V.** West Nile encephalitis. The neuropathology of four fatalities. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 172-8.
 39. **Hubalek Z.** Comparative symptomatology of West Nile fever. *Lancet* 2001; 358: 254-5.
 40. **Vaispapir V, Blum A, Soboh S, Ashkenazi H.** West Nile virus meningoencephalitis with optic neuritis. *Arch Intern Med* 2002; 162: 606-7.
 41. **Komar N, Panella NA, Burns JE, Dusza SW, Mascarenhas TM, Talbot TO.** Serologic evidence of West Nile virus infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 621-5.
 42. **Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, et al.** West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 679-85.
 43. **Kulasekera VL, Kramer L, Nasci RS, et al.** West Nile virus infection on mosquitoes, birds, horses, and humans, State Island, New York, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 722-5.
 44. **Komar N.** West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 58-73.
 45. **Eidson M, Kramer L, Stone W, et al.** Dead bird surveillance as an early warning system from West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 631-5.
 46. **Eidson M, Komar N, Sorhage F, et al.** Crow deaths as a sentinel surveillance system for West Nile virus in the northeastern United States, 1999. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 615-20.
 47. **Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z.** Migratory birds and spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Emerg Infect Dis* 2000; 6(4): 319-27.
 48. **Bin H, Grossman Z, Pokamunski S, et al.** West Nile fever in Israel 1999-2000. From geese to humans. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 127-42.
 49. **Malkinson M, Banet C, Weisman Y, et al.** Introducing of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(4): 392-7.
 50. **Andreadis TG, Anderson JF, Vossbrinck CR.** Mosquito surveillance for West Nile virus in Connecticut, 2000: Isolation from *Culex pipiens*, *Culex restauns*, *Culex salinarius*, and *Culiseta melanura*. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 670-4.
 51. **White DJ, Kramer LD, Backenson PB, et al.** Mosquito surveillance and polymerase chain reaction detection of West Nile virus, New York State. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 643-9.
 52. **Shone SM, Ferrao PN, Lesser CR, Norris DE, Glass GE.** Analysis of mosquito vector species abundances in Maryland using geographic information systems. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 364-8.
 53. **Turell MJ, O'Guinn M, Oliver J.** Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62(3): 413-4.

54. **Sardelis MR, Turell MJ, Dohm DJ, O'Guinn ML.** Vector competence of selected North American *Culex* and *Coquillettidia* mosquitoes for West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(6): 1018-22.
55. **Turell MJ, O'Guinn ML, Dohm DJ, et al.** Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol* 2001; 38: 130-4.
56. **Yang JS, Kim J, Hwang D, et al.** Induction of potent Th1-type immune response from a novel DNA vaccine for West Nile virus New York isolate (WNV-NY1999). *J Infect Dis* 2001; 184: 809-16.
57. **Monath TP, McCarthy K, Bedford P, et al.** Clinical proof of principle for ChimeriVax: recombinant live, attenuated vaccines against Flavivirus infections. *Vaccine* 2002; 20: 1004-18.
58. **Monath TP.** Prospects for development of a vaccine against the West Nile virus. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 1-12.
59. **Shimoni Z, Niven MJ, Pitlick S, Bulvik S.** Treatment of West Nile virus encephalitis with intravenous immunoglobulin. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 759.
60. **Roehrig JT, Staudinger LA, Hunt AR, Mathews JH, Blair CD.** Antibody prophylaxis and therapy for flavivirus encephalitis infections. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 286-97.
61. **Jordan I, Briese T, Fischer N, Yiu-Nam J, Lipkin WI.** Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effects in neural cells. *J Infect Dis* 2000; 182: 1214-7.
62. **Gotham IJ, Eidson M, White DJ, et al.** West Nile virus: a case study in how NY State Health Information infrastructure facilitates preparation and response to disease outbreaks. *J Public Health Manag Pract* 2001; 7(5):75-86
63. **Centers for Disease Control and Prevention.** Update: West Nile-like viral encephalitis – New York, 1999. *MMWR* 1999; 48(39): 890-2.
64. **Centers for Disease Control and Prevention.** Human West Nile virus surveillance – Connecticut, New Jersey, and New York, 2000. *MMWR* 2001; 50(14): 265-8.
65. **Greenberg AJ, Sherman M.** West Nile virus human surveillance in Nassau County, New York: 1999-2000. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 347-50.
66. **Beckwith W, Sirpenski S, Mayo D.** Surveillance for avian-borne arboviruses in Connecticut, 2000. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 336-7.
67. **Kauffman EB, Bernard KA, Jones SA, Maffei, Ngo K, Kramer LD.** West Nile virus laboratory surveillance program. Cost and time analysis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 351-3.
68. **Centers for Disease Control and Prevention.** Guidelines for surveillance, prevention, and control of West Nile virus infection – United States. *MMWR* 2000; 49(2): 25-8.
69. **Centers for Disease Control and Prevention.** Epidemic/epizootic West Nile virus in the United States: Revised guidelines for surveillance, prevention, and control. US Department of Health and Human Services, 2001.
70. **Ford-Jones EL, Fearon M, Leber C, et al.** Human surveillance for West Nile virus infection in Ontario in 2000. *Can Med Assoc J* 2002; 166(1): 29-35.
71. **Ministerio de Salud, Oficina de Epidemiología.** Vigilancia intensificada en salud pública: Situación de las enfermedades transmisibles, Colombia, 1999. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2000; 5(1): 1-11.
72. **Asnis DS, Conetta R, Waldman G, Teixeira AA.** The West Nile virus encephalitis outbreak in the United States (1999-2000). *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 161-71.
73. **Eidson M, Miller J, Kramer L, et al.** Dead crow densities and human cases of West Nile Virus, New York State, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 662-4.
74. **Koma N, Panella NA, Boyce E.** Exposure of domestic mammals to West Nile virus during an outbreak of human encephalitis, New York City, 1999. *Emerg Infect Dis* 2001, 7(4): 736-7.
75. **Work TH, Hurlbut HS, Taylor RM.** Indigenous wild birds of the Nile delta as a potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am J Trop Med Hyg* 1956; 4: 872-88.
76. **Panella NA, Kerst AJ, Lanciotti RS, Bryant P, Wolf B, Komar N.** Comparative West Nile virus detection in organs of naturally infected American crows (*Corvus brachyrhynchos*). *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 754-5.
77. **Salaman, P, Cuadros, T., Jaramillo, J. G., Weber, W.** Lista de chequeo de las aves de Colombia. Sociedad Antioqueña de Ornitología, Medellín, 2001.
78. **Álvarez H.** The social system of the green jay in Colombia. *Liv Bird* 1975; 14: 5-43.
79. **Lanciotti RS, Kerst JK, Nasci RS, et al.** Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11): 4066-71.
80. **Johnson DJ, Ostlund EN, Pedersen DD, Schmitt BJ.** Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 739-41.
81. **Steele KE, Linn MJ, Schoepp RJ, et al.** Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Vet Pathol* 2000; 37(3): 208-24.
82. **Centers for Disease Control and Prevention.** CDC guidelines for arbovirus surveillance programs in the United States. In: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/arboguid.htm>
83. **Langevin SA, Bunning M, Davis B, Komar N.** Experimental infection of chickens as candidate sentinels for West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 726-9.
84. **Swayne DE, Beck JR, Smith CS, Shieh WJ, Zaki SR.** Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 751-3.
85. **Holden P, Muth D, Shriner RB.** Arbovirus hemagglutinin-inhibition in avian sera: inactivation with

- protamine sulfate. Am J Epidemiol 1966; 84: 67-73.
86. **Kramer LD.** West Nile virus infection in birds and mammals. Ann N Y Acad Sci 2001; 951: 84-93.
 87. **Anderson JF, Vossbrinck CR, Andreadis TG, et al.** Characterization of West Nile virus from five species of mosquitoes, nine species of birds, and one mammal. Ann N Y Acad Sci 2001; 951: 328-31.
 88. **Anderson JF, Andreadis TG, Vossbrinck CR, et al.** Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut. Science 1999; 286: 2331-3.
 89. **Garmendia AE, van Kruiningen HJ, French RA, et al.** Recovery and identification of West Nile virus from a hawk in winter. J Clin Microbiol 2000; 38(8): 3110-1.
 90. **Komar N, Panella NA, Boyce E.** Exposure of domestic mammals to West Nile virus during an outbreak of human encephalitis, New York City, 1999. Emerg Infect Dis 2001; 7(4):636-8.
 91. **Trock SC, Meade BJ, Glaser AL, et al.** West Nile virus outbreak among horses in New York State, 1999 and 2000. Emerg Infect Dis 2001; 7(4): 745-7.
 92. **Bunning ML, Bowen RA, Cropp B, et al.** Experimental infection of horses with West Nile virus and their potential to infect mosquitoes and serve as amplifying hosts. Ann N Y Acad Sci 2001; 951: 338-9.
 93. **Dohm DJ, O'Guinn ML, Turell MJ.** Effecto of environmental temperature on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. J Med Entomol 2002; 39(1): 221-5.
 94. **Turell MJ, Sardelis MR, Dohm DJ, O'Guinn ML.** Potential North American vectors of West Nile virus. Ann N Y Acad Sci 2001; 951: 317-24.
 95. **Nash D, Mostashari F, Fine A, et al.** The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. N Eng J Med 2001; 344(24): 1807-14.
 96. **Chowers MY, Lang R, Nassar F, et al.** Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. Emerg Infect Dis 2001; 7(4): 675-8.
 97. **Wong SJ, Seligman SJ.** Long-term stability of West Nile virus IgM and IgG antibodies in diluted sera stored at 4°C. Ann N Y Acad Sci 2001; 951: 369-72.
 98. **Wang T, Anderson JF, Magnarelli LA, et al.** West Nile virus envelope protein. Role of diagnosis and immunity. Ann N Y Acad Sci 2001; 951:325-7.
 99. **Tardei G, Ruta S, Chitu V, Rossi C, Tsai TF, Cernescu C.** Evaluation of immunoglobulin M (IGM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile virus infection. J Clin Microbiol 2000; 38(6): 2232-9.
 100. **Shieh WJ, Guarner J, Layton M, et al.** The role of pathology in an investigation of an outbreak of West Nile encephalitis in New York, 1999. Emerg Infect Dis 2000; 6(4): 370-2.
 101. **Centers for Disease Control and Prevention.** Human West Nile virus surveillance - Connecticut, New Jersey, and New York, 2000. MMWR 2001; 50(14): 265-8.
 102. **Eidson M.** "Neon needles" in a haystack. The advantages of passive surveillance for West Nile virus. Ann N Y Acad Sci 2001; 951: 38-53.
 103. **Briese T, Glass WG, Lipkon WI.** Detection of West Nile virus sequences in cerebrospinal fluid. Lancet 2000; 355: 1614-5.
 104. **Fine A, Mostashari F, Nash D, et al.** Testing for West Nile virus. Lancet 2000; 356: 1110-1.