

Evidencia serológica del Virus del Nilo Occidental en equinos (*Equus caballus*), en el área natural protegida laguna El Jocotal, departamento de San Miguel, El Salvador

Escalante-Hernández, M.N.
Estudiante Tesista,
Departamento de Medicina Veterinaria,
Facultad de Ciencias Agronómicas,
Universidad de El Salvador.

López-Salazar, C.D.
Docente Director,
Departamento de Medicina Veterinaria,
Facultad de Ciencias Agronómicas,
Universidad de El Salvador.

Avendaño-Romero, N.O.
Docente Director,
División de Servicios Veterinarios,
Ministerio de Agricultura y Ganadería, El Salvador.

Quintanilla-Moreno, G.A.
Estudiante Tesista,
Departamento de Medicina Veterinaria,
Facultad de Ciencias Agronómicas,
Universidad de El Salvador.

Romero-Pérez, L.E.
Docente Director,
Departamento de Medicina Veterinaria,
Facultad de Ciencias Agronómicas,
Universidad de El Salvador.

Resumen

La investigación se realizó en caballos del área natural protegida laguna El Jocotal, sitio Ramsar (incluido en la lista de la Convención Relativa a los Humedales de Importancia Internacional especialmente como Hábitat de Aves Acuáticas) del departamento de San Miguel, El Salvador. El estudio fue de carácter descriptivo, se incluyó la totalidad de ejemplares, equivalente a una población de 91 caballos dispersos en 29 unidades productivas en un perímetro de hasta 5km a la redonda del humedal principal laguna El Jocotal y del cuerpo de agua permanente laguna Agua Caliente. La fase de campo se desarrolló en el período comprendido de septiembre a diciembre de 2015, las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción en la vena yugular, se separó la sangre del suero y se conservó en refrigeración. El procesamiento de las muestras se realizó en la Red de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) de El Salvador. Se utilizó un ensayo inmunoenzimático de bloqueo (ELISA) con el propósito de evidenciar serológicamente la presencia o ausencia de anticuerpos específicos del virus del Nilo Occidental (VNO). Se registra la primera evidencia de actividad por el VNO en caballos de un sitio Ramsar del país y una de las seroprevalencias más altas en Latinoamérica con el 89% de caballos seropositivos, 4.40% de seronegativos y 6.60% sospechosos. Se analizaron diversos factores que pudieron influir en los resultados obtenidos, entre éstos la prueba diagnóstica utilizada, la proximidad de las poblaciones equinas a las zonas identificadas de riesgo y el área geográfica en estudio. Se estableció la distribución geográfica de la población equina susceptible, mediante el uso del sistema de posicionamiento global (GPS) y por imagen de mapa mediante el software ArcGis. Además se aportaron datos epidemiológicos actualizados que podrán ser empleadas como recursos para futuras investigaciones en materia de salud pública, sanidad animal y medioambiental.

Palabras clave: Virus, Nilo, Occidental, Seroprevalencia ,VNO, caballos, Jocotal.

Abstract

The following research was carried out in horses from the natural protected area: laguna El Jocotal, Ramsar place (included in the list of the Convention on Wetlands of International Importance especially as Waterfowl Habitat) from San Miguel, El Salvador. In the descriptive study all animals were included, equivalent to a population of 91 horses located in 29 productive units within a perimeter of 5 kms around the main wetland of natural and seasonal pools of water at laguna El Jocotal and laguna Agua Caliente. The field phase took place from September to December 2015. The blood samples were obtained by puncture in the jugular vein, the blood was separated from the serum and kept refrigerated. Samples were processed at the Red de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) de El Salvador, analyzed by blocking immunosorbent assay (ELISA) with the purpose of serologically detection of the presence or absence of specific antibodies of West Nile virus (WNV). The first evidence of WNV activity in horses at the Ramsar site was found one of the highest seroprevalences in Latin America with 89.01% of 4.40% seronegative horses and 6.59% suspect horses. There are several factors to take into account in the finding obtained, among them the diagnostic test used, the proximity of equine populations within the identified risk areas and the geographic area of study. The geographical distribution of the susceptible equine population was established by using the global positioning system (GPS) and maps using ArcGIS software. Furthermore, the epidemiological data will be available for further research to be used as resources to attend issues on public health, animal, and environmental health.

Key words: West, Nile, Virus, WNV Seroprevalence, horses, Jocotal.

Introducción

El Virus del Nilo Occidental (VNO) es un virus aviar zoonótico transmitido por mosquitos, que puede cursar con enfermedad neurológica y eventualmente fatal en algunas especies de mamíferos incluyendo seres humanos, reptiles y aves. La mayoría de los casos clínicos se producen en humanos y caballos que son hospedadores finales del virus (CFSPH/IICAB, 2010). Las aves tienen la capacidad de transportar el virus a nuevas regiones, dándoles el título de amplificadores del virus; en las cuales el nivel y duración de la viremia varían según la especie (CFSPH/IICAB, 2010). En Norteamérica las aves que forman parte del ciclo de transmisión para el VNO son algunas especies de las familias Corvidae, Icteridae, Fringillidae y Passeridae con altos índices de competencia, Laridae, Turdidae, Charadriidae, Strigidae, y Falconidae con índices moderados y Anatidae, Columbidae, Picidae, Rallidae, Phasianidae, y Psittacidae con títulos bajos de competencia (Komar, 2003).

Desde el apareamiento de los primeros casos del virus en Norteamérica en 1999, el VNO se diseminó hacia Centroamérica, Suramérica y el Caribe (CFSPH/IICAB, 2010) convirtiéndose en un problema de salud pública al encontrarse en el continente americano tanto los vectores como los reservorios, condiciones ecológicas y hábitats propicios para la presentación de su ciclo de transmisión. Las rutas de aves migratorias favorecen la diseminación del virus en todo el continente (CFSPH/IICAB, 2010).

La transmisión a los hospedadores aviares representa un ciclo primario, enzoótico, o de amplificación, en el cual los mosquitos ornitofílicos principalmente del género *Culex* sp. Se alimentan de aves virémicas y si se dan las condiciones apropiadas de temperatura, especies de mosquitos, densidad de población de mosquitos, número de hospedadores susceptibles, etc., se producirá una epizootia en la población aviar. El ciclo secundario envuelve a artrópodos mosquitos infectados que transmiten la infección a otros hospederos finales como caballos y humanos (OPS, 2013). En algunos équidos una rápida viremia de baja titulación precede la aparición de los signos clínicos (OIE, 2013), sin embargo, el mayor porcentaje de caballos se infectan de forma asintomática (CFSPH/IICAB, 2010). Todos los equinos parecen ser igualmente susceptibles a la encefalomiелitis del VNO.

Uno de los métodos diagnósticos para identificar los anticuerpos específicos para el VNO en el suero equino es mediante el enzoinmunoanálisis ELISA con IgM o IgG. Generalmente, los anticuerpos IgM específicos de VNO

equino son detectables entre los 7-10 días hasta 1-2 meses después de la infección. Los anticuerpos neutralizantes de VNO son detectables en el suero equino dos semanas después de la infección y pueden persistir durante más de un año; en algunas pruebas serológicas, se pueden encontrar reacciones cruzadas entre los anticuerpos con flavivirus relacionados, como el virus de la encefalitis de St. Louis o los virus del serocomplejo de la encefalitis japonesa (OIE, 2013).

En El Salvador el primer reporte de VNO en equinos corresponde a diez muestras positivas por medio de la prueba de neutralización por reducción en placas en el año 2003 (Cruz, 2003); sin embargo, el mismo año, otro estudio realizado por médicos de Servicios Veterinarios del MAG, no reportó serología positiva en 116 muestras evaluadas mediante ELISA de captura. El VNO está incluido en lista de las enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal desde el 2006, tiempo desde el cual El Salvador no ha reportado evidencia en la base de datos del sistema mundial de información zoonosanitaria (WAHID) de la OIE por no contar con un estudio oficial que demuestre evidencia serológica del virus.

En este estudio descriptivo se evidencia la circulación de anticuerpos para el VNO en caballos en la periferia del humedal Ramsar laguna El Jocotal, además se realizó la identificación espacial de la zona de riesgo con la distribución de la población equina y áreas rurales de población humana; conjuntamente se analizaron los factores epidemiológicos involucrados en los hallazgos de seroprevalencia frente al flavivirus del Virus del Nilo Occidental, aportando datos actualizados que servirán como un precedente para la realización de futuras investigaciones en materia de salud pública, sanidad animal y medio ambiental por parte de las entidades competentes.

Materiales y Métodos

Ubicación geográfica y condiciones ecológicas

El estudio se realizó en la periferia de los cuerpos de agua laguna El Jocotal y laguna Agua Caliente, ubicados a los extremos opuestos del complejo de humedales del área natural protegida laguna El Jocotal; esta cuenta con 4,279 hectáreas de extensión, posee una altitud media de 30 msnm y se encuentra ubicada en la zona oriental en los municipios de El Tránsito, San Miguel, Chirilagua y Jucuarán, los tres primeros del departamento de San Miguel y el último de Usulután (MARN, 2013).

El complejo de humedales sustenta una diversidad de comunidades ecológicas, entre las cuales se registra una población aviar que supera las 20,000 aves migratorias y residentes que encuentran en éste sitio Ramsar hábitat, refugio y alimento.

Metodología de campo

Se realizó un censo para obtener el dato de población equina, además se utilizó el instrumento de la encuesta epidemiológica para recolectar información pertinente a cada individuo y antecedentes asociados a signos evidentes de enfermedad neurológica. Se estudió una población de 91 caballos (*Equus caballus*) pertenecientes a 29 unidades productivas incluidas en un perímetro de 5km a la redonda de los dos humedales, cuatro unidades productivas se situaban en la periferia del cuerpo de agua laguna El Jocotal, con una totalidad de 39 caballos (43%) y 25 unidades productivas en la periferia de la laguna Agua Caliente, con una sumatoria de 52 caballos (57%).

Se tomaron las coordenadas geográficas de las unidades productivas en estudio, utilizando un equipo de sistema de posicionamiento global GPS con precisión de 5 m, tomando las coordenadas geográficas (latitud y longitud en grados decimales). Los datos obtenidos se ordenaron y tabularon en una tabla Excel® y se transfirió dicha información a archivos shapefile para la elaboración de modelos cartográficos utilizando el sistema de información software ArcGIS 10.3. ®

Las muestras sanguíneas se obtuvieron mediante punción en la vena yugular, extrayendo 10ml con aguja descartable doble bisel (20Gx 1½”) conectada a un tubo tapón rojo al vacío sin anticoagulante. Para la obtención de suero se colocó al tubo en reposo a temperatura ambiente para la retracción del coágulo y separación del suero. Cada muestra se identificó conforme a la unidad productiva a la cual pertenecían y su número correlativo.

El transporte al Laboratorio de ELISA de la Red de Laboratorios Veterinarios del MAG, se realizó con los tubos en posición vertical y se conservaron en hielera a 4°C. En las instalaciones del laboratorio se extrajo el suero de cada muestra con una pipeta estéril, depositándose 1.5 ml en crioviales individuales para su conservación y almacenamiento.

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos del Virus del Nilo Occidental.

Se utilizó un ensayo inmunoenzimático de bloqueo que posee la capacidad de detectar títulos bajos de anticuerpos en sueros de equinos infectados.

Se realizó el procedimiento de acuerdo a las instrucciones del fabricante (INGENASA, 2010).

Se depositaron las muestras de suero sobre un soporte sólido (placa de poliestireno) que contenía el antígeno viral inactivado. Las muestras que contenían IgM e IgG específicas, se unieron al antígeno fijado en la placa. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añadió un anticuerpo monoclonal específico del ectodominio de la glicoproteína E conjugado con peroxidasa. Las muestras que contenían anticuerpos impidieron la unión del conjugado, mientras que las muestras que no presentaban este tipo de anticuerpos, permitieron la unión libre del anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa al antígeno de la placa (INGENASA, 2010).

Tras sucesivos lavados para eliminar el material no unido, se revelaron las reacciones acontecidas en la placa mediante la adición de un sustrato que desarrolló una reacción colorimétrica en presencia de peroxidasa. La aparición de una reacción coloreada, indicaba que la muestra ensayada no contenía anticuerpos específicos al VNO y la ausencia de color indicaba la positividad de la muestra conteniendo dichos anticuerpos (INGENASA, 2010).

Se procedió la lectura de los valores de absorbancia de 450 nm en los cinco minutos, siguientes a la adición de la solución de frenado con el espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan EX®. Se calculó el porcentaje de inhibición (PI) de la muestra, y posteriormente se dio lectura al resultado de cada muestra, considerándose positivas, negativas y sospechosas según las especificaciones descritas en el manual técnico del ELISA de bloqueo (INGENASA, 2010).

Metodología estadística

Una vez obtenida la información de campo y laboratorio se procesó haciendo uso de estadística descriptiva por medio de cuadros, gráficas y fórmula de prevalencia.

$$\text{Seroprevalencia} = \frac{\text{nº de equinos seropositivos en un punto del tiempo}}{\text{equinos en ese punto del tiempo}} \times 100$$

$$\text{Seroprevalencia} = \frac{\text{nº de equinos seropositivos en un punto del tiempo}}{\text{Población de equinos en ese punto del tiempo}} \times 100$$

Resultados y Discusión

De las 91 unidades experimentales incluidas en el perímetro de 5km a la redonda de los cuerpos de agua laguna El Jocotal y laguna Agua Caliente (Fig. 1), se obtuvo una seroprevalencia del 89.01% de anticuerpos contra el Virus del Nilo Occidental, 6.59% reflejaron una respuesta serológica sospechosa y un 4.40% resultaron seronegativos (Fig. 2). Los caballos incluidos en el estudio fueron 55 hembras y 36 machos con edades que oscilaron desde los 2 meses hasta los 30 años de edad, en su mayoría fueron equinos jóvenes, criollos, con manejo principalmente a libre pastoreo y utilizados para trabajo. No se consideraron someter a evaluación las variables edad, sexo, casta y manejo de los caballos debido a que diferentes autores han manifestado no ser factores predisponentes para la infección por el VNO (Rey y Rutledge, 2001).

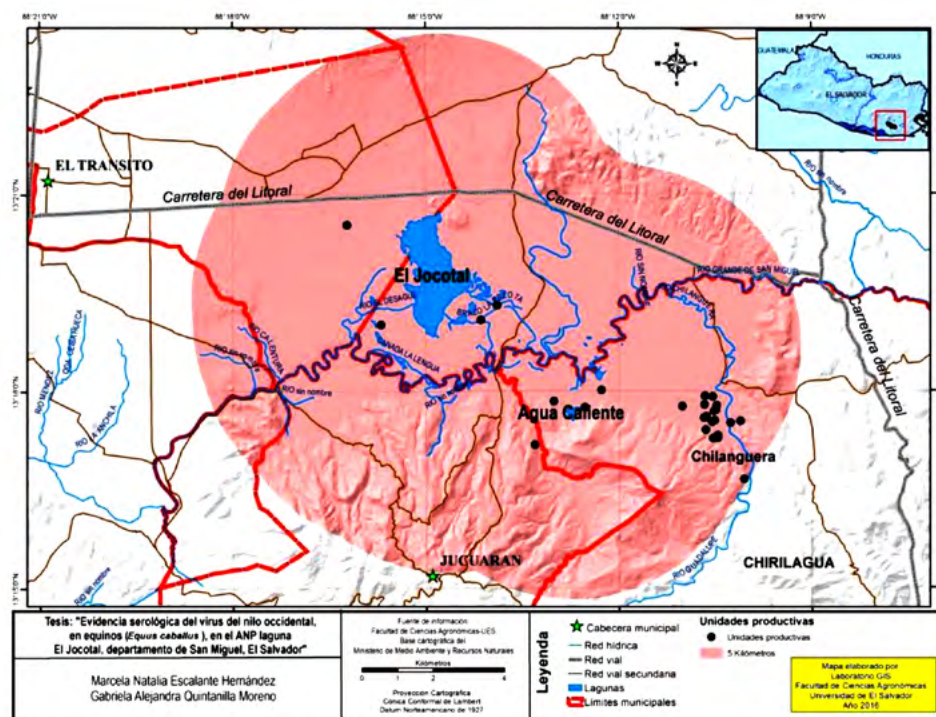


Figura 1. Ubicación geográfica de los cuerpos de agua laguna El Jocotal y laguna Agua Caliente con sus respectivas unidades productivas.

Se registra la seroprevalencia más alta (89.01%) frente a anticuerpos contra el Virus del Nilo Occidental en caballos de Latinoamérica. En la región diferentes investigadores determinaron porcentajes variables de seroprevalencia; en el año 2002, México reportó el nivel más alto de seroprevalencia en la región con el 62.5% (Coahuila) diagnosticados por ELISA de bloqueo y neutralización por reducción en placas (PNRP) (Blitvich *et al.*, 2003), y el más bajo con el 1.2% (Yucatán) bajo la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH), y confirmado por PNRP (Loroño *et al.*, 2003). Otra investigación desarrollada en 2013, estableció una seroprevalencia de 18.6% en el estado de Guerrero (Cortés *et al.*, 2013). En Guatemala entre 2003 y 2004 se estableció una prevalencia de anticuerpos del 42.3% por ELISA de bloqueo en muestras procedentes de 19 departamentos (Morales *et al.*, 2006), mientras que, en Costa Rica en 2004, se determinó una seroprevalencia del 28% en caballos de la península de Nicoya (Hobson *et al.*, 2004).

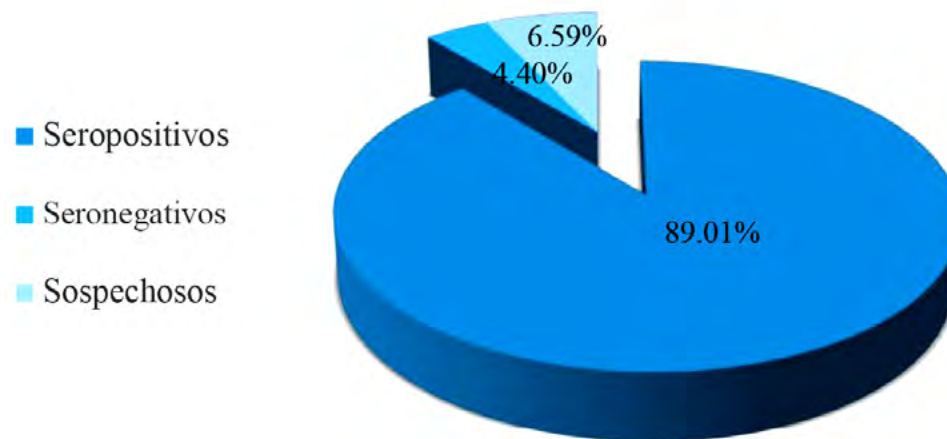


Figura 2. Resultados del diagnóstico serológico frente al virus del Nilo Occidental en caballos del área natural protegida laguna El Jocotal.

La ausencia de sintomatología reportada en los equinos en estudio, puede estar influenciada por el desconocimiento de los propietarios, pero también por la presencia de infecciones asintomáticas que puede ocurrir en zonas endémicas con altos índices de seroprevalencia (CFSPH/IICAB, 2010). La respuesta serológica establecida en la presente investigación difiere de las investigaciones realizadas en la región y se considera que pueden influir en los resultados obtenidos, entre ellos la prueba diagnóstica utilizada, la proximidad de las poblaciones equinas a las zonas identificadas de riesgo, las áreas geográficas en estudio e inmunizaciones por vacunación.

En relación a las pruebas diagnósticas, la presencia de otros flavivirus relacionados al serocomplejo de la Encefalitis Japonesa, es un factor determinante en las altas

seroprevalencias por ser asociadas a reacciones cruzadas (OIE, 2013), lo cual se ha demostrado en un estudio realizado en Guatemala entre 2003 y 2004, donde 70 muestras positivas al VNO utilizando un ELISA de bloqueo, fueron confirmadas por medio de PNRT, resultando solamente 9 muestras positivas al VNO, 33 al virus de la encefalitis de San Luis y 21 muestras a otros flavivirus (Morales *et al.*, 2006).

La prueba serológica ELISA de bloqueo empleada en esta investigación, posee la capacidad de detectar inmunoglobulinas IgM e IgG del VNO; lo que permitiría un amplio rango en el tiempo para la detención de anticuerpos, ya que, de acuerdo a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), las IgM son detectables desde los 7-10 días hasta 1 ó 2 meses después de la infección y la IgG por un tiempo superior a un año (OIE, 2013).

Es importante considerar la proximidad de los caballos que deambulan en la periferia de los humedales, ya que éstos se encontraban dispersos en una distancia no mayor a 5 km para cada uno de los cuerpos de agua; a diferencia de la mayoría de publicaciones realizadas en la región Mesoamericana, en las cuales no se consideraron áreas circunscritas a humedales para la selección de las muestras en estudio. Los humedales poseen especial importancia en la epidemiología del Virus del Nilo Occidental, ya que la dimensión de estos ecosistemas, propician la transmisión del virus y el establecimiento de la enfermedad en poblaciones de humanos y caballos. Sobre la base de las consideraciones anteriores Barriga *et al.*, (2002), refiere que los tres brotes de mayor magnitud registrados en humanos han sido: Sureste de Rumania 1996, Volgogrado 1999 y Nueva York 1999, ciudades localizadas cerca de grandes cuerpos de agua y en el paso de rutas de aves migratorias.

En el ecosistema del complejo laguna El Jocotal, existe una mayor probabilidad para la interacción entre los elementos de la triada epidemiológica: agente causal (Virus del Nilo Occidental), hospedadores (aves migratorias y caballos) y medioambiente (humedales y mosquitos). El humedal como reserva ecológica, sustenta de manera regular una población que supera las 20,000 aves acuáticas, entre ellas migratorias y residentes, identificándose siete familias de aves de alta y moderada competencia en la transmisión del virus (Corvidae, Fringillidae, Icteridae, Charadriidae, Falconidae, Laridae, Strigidae) (MARN, 2013). Los caballos evaluados durante el estudio son utilizados en actividades de transporte y trabajo, además de realizar actividades de pastoreo en la periferia de los espejos de agua; teniendo como factor determinante la exposición a densas poblaciones de mosquitos los cuales interactúan con las aves migratorias y residentes.

Aunque en el humedal laguna El Jocotal no se han establecido las especies de mosquitos presentes, en El Salvador se ha demostrado la existencia de al menos dos de las principales especies de mosquitos eficaces en la transmisión del VNO; mediante un estudio entomológico realizado en el año 2003 por el Ministerio de Salud, en el cual se identificaron larvas y adultos de las especies *Aedes aegypti*, *Culex nigripalpus*, *Culex pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* (Cruz, 2003) siendo éstas dos últimas, reconocidas como vectores en la transmisión del VNO según el Centro para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública de Estados Unidos (CFSPH/IICAB, 2010). Según Clements, citado por García (2007) *Culex quinquefasciatus* es el mosquito más frecuentemente encontrado en el ambiente humano, tanto urbano como rural, está distribuido en zonas tropicales y subtropicales, frecuentando ecosistemas como humedales, lagunas y charcos temporales, presenta un rango de dispersión que no excede un radio de vuelo de más de 500m, pero excepcionalmente puede alcanzar hasta 5 kilómetros.

Se descarta que la inmunización por vacunación sea un factor responsable del alto número de caballos seropositivos, debido a que el 100% de los propietarios manifestó nunca haber utilizado vacunas contra el VNO ni contra otras enfermedades del serocomplejo de la Encefalitis Japonesa, además desconocen de ellas.

En la figura 3 se visualiza la ubicación de los equinos seropositivos distribuidos espacialmente en una distancia de hasta 5 km a la redonda de los dos cuerpos de agua en estudio, área considerada en la investigación por la capacidad de vuelo de los mosquitos involucrados en la transmisión del virus a humanos y equinos.

La mayor concentración de los equinos seropositivos se localizó en el cantón Chilanguera del municipio de Chirilagua debido a la mayor cantidad de población equina en estrecha relación y convivencia con las poblaciones humanas y en menor proporción en cascos de hacienda de la periferia del humedal El Jocotal de los municipios El Tránsito y San Miguel, en donde existen muy pocos asentamientos humanos.

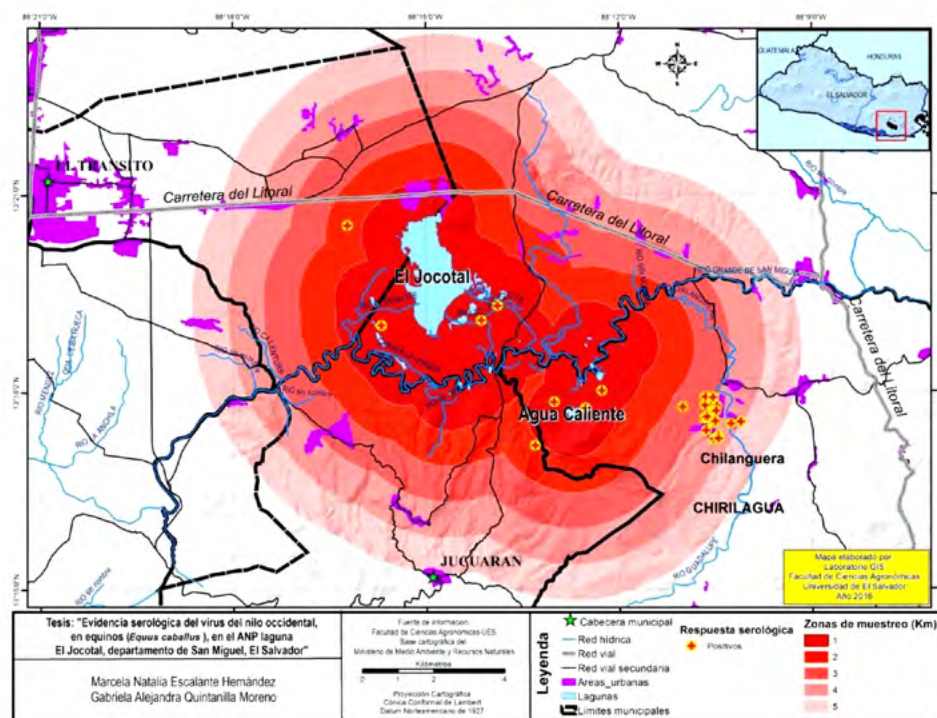


Figura 3. Distribución de equinos seropositivos a un perímetro de 5 km de los cuerpos de agua laguna El Jocotal y laguna Agua Caliente.

Conclusiones

Este estudio demuestra la circulación de anticuerpos para el Virus del Nilo Occidental en caballos en la periferia de un humedal Ramsar.

En el presente estudio se reporta una de las seroprevalencias más elevadas en equinos en Latinoamérica considerando que la prueba diagnóstica utilizada, la proximidad de las poblaciones equinas a la zona de riesgo y el área geográfica en estudio pueden influir en el resultado serológico.

Mediante el uso del kit ELISA Ingezim West Nile Compac, se estableció una seroprevalencia del 89% frente al Virus del Nilo Occidental en caballos del área natural protegida laguna El Jocotal, ubicada en los departamentos de San Miguel y Usulután; 6.59% reflejaron una respuesta serológica sospechosa, mientras que el 4.40% resultaron seronegativos.

La seropositividad no se asocia a la inmunización por vacunación contra el VNO sino a un proceso natural, ya que el 100% de los propietarios manifestaron desconocer la vacuna contra el Virus del Nilo Occidental y en consecuencia nunca la han aplicado.

El área natural protegida laguna el Jocotal se puede considerar como un área de riesgo para el VNO ya que según OPS (2013), una zona de riesgo está definida por la presencia y circulación de uno o más de los virus responsables de ocasionar encefalitis equinas o bien aquellas que presentan características ecológicas y medio ambientales propicias para el desarrollo y proliferación de los vectores responsables de estas zoonosis.

Los datos de georreferenciación de la población equina presentados en la investigación permitieron establecer por imagen de mapa la distribución espacial de los animales seropositivos frente al VNO, sus rutas de acceso y concentraciones de poblaciones humanas y equinas.

Bibliografía

- Barriga Angulo, G; Arumir Escorza, C; Mercado Gonzales, F. 2002. Actualidades sobre la fiebre del Nilo. *Revista Mexicana de Patología Clínica* 4: 203-211.
- Blitvich, BJ; Fernández, I; Contreras, J. 2003. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila, Mexico. *Emerging infectious diseases*. 9(7): 853.
- CFSPH (Centro para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública, US); IICAB (Instituto para la Cooperación Internacional en Biología Animal, US). 2010. Enfermedades emergentes y exóticas de los animales: Fiebre del Nilo Occidental. Eds. Spickler, AR; Roth, JA; Gaylon, J; Lofstedt, J; Lenardón, MV. Primera ed. Iowa, Ames, US. P.25, 60- 62, 170-177.

- Cortés, AJ. 2013. Identificación de mosquitos vectores potenciales y seroprevalencia del virus del Oeste del Nilo en aves y equinos en el estado de Guerrero, México. Tesis Doctorado en ciencias entomológicas. México, UANL. p 22,33-46.
- Cruz, L. 2003. Epizootia de Encefalitis Equina por Virus del Nilo Occidental en El Salvador (en línea). San Salvador, SV. Consultado 19 jul. 2016. Disponible en http://www.researchgate.net/publication/237480339_Epizotia_de_Encefalitis_Equina_por_Virus_del_Nilo_Occidental_en_El_Salvador_2001-2003
- García, OC; Londoño Benavidez, YL. 2007. Adaptación de *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) a tres diferentes pisos térmico bajo condiciones de laboratorio. Tesis Veterinaria, Bogotá Colombia. UNISALLE. p 4-25.
- Hobson-Peters, J; Arévalo, C; Cheah, WY; Blitvich, BJ. 2004. Detection of Antibodies to West Nile Virus in Horses, Costa Rica. Vector-borne and zoonotic diseases. 11(8): 1082.
- INGENASA (Inmunología y Genética Aplicada, S. A., ES). 2010. Ingezim West Nile Compac. Madrid, ES. P. 1-6.
- Komar, O. 2003. Introducción del Virus del Nilo Occidental en América. San Salvador, SV. Aves migratorias y residentes, y el Virus del Oeste del Nilo en Centroamérica. Ed. Komar, O. (Memoria). Colorado, US. P. 16.
- Loroño, MA; Blitvich, BJ; Farfán, JA. 2003 Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan, Mexico. Emerging infectious diseases. 9(7): 857-858.
- MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2013. Humedales (en línea). Consultado 12 jun. 2016. Disponible en <http://www.marn.sv/temas/biodiversidad/humedales.html>
- Morales, ME; Morales, H; Blitvich, B. 2006. Virus del Nilo Occidental en los caballos. Emerging infectious diseases. 12(6): 1028.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal, FR). 2013. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas para los Animales Terrestres: Fiebre del Nilo Occidental (en línea). 7ª ed. París, FR. Consultado 01 jun. 2016. PDF. Disponible en http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.20_WEST_NILE.pf
- OPS (Organización Panamericana de la Salud, US); OMS (Organización Mundial de la Salud, CH). Oficina Regional para las Américas, US; OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, SV). 2013. Guía para la vigilancia, detección y respuesta para las encefalitis equinas. Eds. R Montoya; M Guardo; A Clavijo; J Naranjo; LA Espinoza; A De García. New ed., Washington D.C. US. s.n.t. 8, 58-70 p. (Serie de manuales técnicos: 17).
- Petersen, LR; Hayes, EB. 2008. Virus del Nilo Occidental en el continente americano. Clínicas médicas de Norteamérica. 92(6): 1307 – 1322.
- Petracci, PF; Canevari, M; Berner, E. 2005. Guía de las aves playeras y marinas migratorias del sur de América del Sur. (En línea). Programa escuela de las aves playeras. Consultado 5 abr. 2016. Disponible en: http://awsassets.wwfar.panda.org/downloads/guia_aves_marinas_y_migratorias_sudamericanas.
- Rey,RJ; Rutledge,CR. 2001. Riesgo y prevención del Virus del Nilo Occidental en Caballos en Florida (en línea). Entomology and Nematology. Consultado 2 abr. 2016. Dispon Montecinos, JI. 2008. Análisis cualitativo de riesgo de introducción del virus Nilo Occidental en Chile. Tesis Medicina Veterinaria. Santiago, Chile, UCH. p 34-39. Disponible en <http://edis.ifas.ufl.edu>