



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

**DETECCIÓN DE ORTHOMYXOVIRUS Y PARAMYXOVIRUS
EN ANÁTIDOS DE LA LAGUNA DE CHICONAHUAPAN,
ESTADO DE MÉXICO**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

P R E S E N T A

Edgar Arturo Cuevas Domínguez

TUTOR:

Dr. José Antonio Quintana López

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Elizabeth Loza-Rubio

Dr. Carlos González-Rebeles

México, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DECLARACIÓN

El autor da su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la presente tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción o intercambio bibliotecario.

M.V.Z. Edgar Arturo Cuevas Domínguez.

Dedicatoria a:

A mis Padres y Hermanas:

A quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo: Amor.

A quienes sin escatimar esfuerzo alguno,
han sacrificado gran parte de su vida,
para formarme y educarme.

A quienes la ilusión de su vida ha sido
convertirme en persona de provecho.

A quienes nunca podré pagar todos sus
desvelos, ni aun con las riquezas más
grandes del mundo.

Por esto y más... Gracias.

Quiero expresar mi agradecimiento...

A mi Tutor de tesis, Dr. José Antonio Quintana López, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad.

A mi Comité Tutorial los Drs. Elizabeth Loza Rubio y Carlos González Rebeles, por sus valiosas críticas y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Gary García Espinosa, por su presencia incondicional y la oportunidad de compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante la realización del proyecto, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A mis profesores y compañeros de posgrado por su continuo y afectuoso aliento, en especial a Sofía González Guzmán, por demostrarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

Al Biólogo Pedro Esteban Díaz Díaz y al M.V.Z Jesús Chávez Ponce, por la permanente disposición y desinteresada ayuda.

A la Dirección General de Vida Silvestre de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) Distrito Federal y del Estado de México, por el apoyo logístico y de información durante el proyecto.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en especial los académicos, alumnos y personas que integran el Departamento de Producción Animal Aves, por su calidez y compañerismo durante este trabajo.

Y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para este proyecto de investigación No. de Registro 201690.

Muchas gracias...

RESUMEN

Edgar Arturo Cuevas Domínguez. Detección de orthomyxovirus y paramyxovirus en anátidos de la laguna de Chiconahuapan, Estado de México. (Bajo la dirección de José Antonio Quintana López, Elizabeth Loza Rubio, Carlos González-Rebeles Islas)

El objetivo fue detectar la existencia de orthomyxovirus y paramyxovirus en anátidos silvestres. Se realizó la prueba de la inhibición de la hemoaglutinación en 231 muestras de siete diferentes especies de anátidos, provenientes de la región central del país, a los cuales se les tomó muestra de cloaca y tráquea mediante hisopos de algodón y conservados en medios de transporte viral. Se realizó inoculación en embriones pollo SPF de 9 días de edad para la obtención de aislamientos virales.

Se obtuvieron dos aislamientos virales, uno de los cuales correspondió a un orthomyxovirus (virus de influenza aviar tipo A) H7N3, proveniente de una cerceta canela (*Anas cyanoptera*) macho. El segundo virus aislado, correspondió a un paramyxovirus Tipo 1 (Enfermedad de Newcastle) proveniente de una cerceta alas azules (*Anas discors*) macho. Ambos aislamientos se lograron durante el mes de Febrero de 2006.

Se concluye que en la Laguna de Chiconahuapan, perteneciente a las ciénegas de Lerma existen orthomyxovirus y paramyxovirus aviares aislados de los individuos pertenecientes a la población de anátidos silvestres, que se congregan en el humedal, los cuales pudieron ser detectados por la prueba de hemoaglutinación, es importante una mejor comprensión de la epidemiología de la enfermedad, sin embargo se recomienda continuar el monitoreo de la población de anátidos de la región del Estado de México, bajo un modelo que comprenda especies distintas a los anátidos que pudieran tener algún papel en la perpetuación de los virus que puedan estar presentes en el humedal y las posibilidades de intercambio viral dentro áreas ecológicas similares.

ABSTRACT

Edgar Arturo Cuevas Domínguez. Orthomyxovirus and paramyxovirus detection in waterfowl of the wetland Chiconahuapan, State of Mexico. (By the direction of José Antonio Quintana López, Elizabeth Loza-Rubio, Carlos González-Rebeles Islas)

The objective was to detect orthomyxovirus and paramyxovirus which could exist in waterfowl, by the hemagglutination inhibition test in 231 samples from seven different duck species, coming from the central region of Lerma, State of Mexico. For that cloacal and tracheal samples were taken by dry sterile cotton swabs and conserved in viral transport medium. All samples were inoculated in chicken embryos SPF, 9 days old injected into the allantoic sac in order to obtain of viral isolations.

Two viral isolations were detected, one of those were an orthomyxovirus (avian influenza virus A type) H7N3 coming from a male cinnamon teal (*Anas cyanoptera*) and the second virus isolated was a paramyxovirus Type 1 (Newcastle disease) coming from a male blue-winged teal (*Anas discors*).

In conclusion, is that in the wetland of Chiconahuapan, belonging to the wetlands of Lerma, exist both sort of viruses in the wild population of waterfowls that arrives to the wetland. These virus could be detected by the hemagglutination activity, but it is important a better understanding of the epidemiology of the viral transmission.

The recommendation is to continue the surveillance of the waterfowl population in the region of the State of Mexico and using a model that understands the participation of different species, in which the waterfowl could role a paper of viral perpetuation in the wetland and the possibilities of viral exchange inside similar Mexican wetlands.

ÍNDICE	PAG.
1. Introducción.....	1
2. Objetivo.....	6
3. Hipótesis.....	7
4. Justificación.....	8
5. Antecedentes.....	9
5.1. Myxovirus.....	9
5.2 Orthomyxovirus.....	9
5.2.1 Características del virus de Influenza Aviar.....	10
5.2.2. Hospedadores.....	11
5.2.3. Transmisión.....	13
5.3. Paramyxovirus.....	14
5.3.1. Características del virus de Newcastle.....	15
5.3.2 Hospedadores.....	15
5.3.3 Transmisión.....	18
6. Materiales y Métodos.....	20

6.1.	Área de Estudio.....	20
6.2.	Animales.....	20
6.3.	Etapas del Estudio.....	21
7.	Resultados.....	23
8.	Discusión.....	25
8.1.	Orthomyxovirus.....	25
8.2	Paramyxovirus.....	29
9.	Conclusiones.....	32
10.	Recomendaciones.....	32
11.	Anexos.....	34
12.	Literatura Citada.....	47

LISTA DE CUADROS Y GRÁFICOS

Cuadro 1: Cantidad de especies monitoreadas durante la realización del estudio, durante la temporada cinegética 2005-2006, en La Laguna de Chiconahuapan, Estado de México.....23

Gráfico 1. Composición porcentual de las especies monitoreadas, durante la temporada cinegética 2005-2006, en La Laguna de Chiconahuapan, Estado de México.....24

Cuadro2: Aislamientos virales durante el monitoreo de la temporada de cacería 2005-2006, en la laguna de Chiconahuapan, Estado de México.....24

1. INTRODUCCIÓN:

Las poblaciones de animales silvestres que habitan el planeta son extraordinariamente numerosas y diversas. México está considerado como un país megadiverso, ya que ocupa el décimo primer lugar a nivel mundial en número de especies animales y vegetales; sin embargo, no escapa de la acelerada pérdida y transformación de los ecosistemas naturales, que han generado una crisis ambiental, económica y sanitaria a nivel mundial.¹ Uno de los sectores amenazados de la biodiversidad de México son las aves silvestres, las cuales están representadas por 1050 especies.²

Las aves migratorias provenientes de América del Norte constituyen un componente especialmente importante en la diversidad de las comunidades de aves que encontramos en las distintas regiones geográficas de México, contribuyendo al 20% aproximadamente del total de las especies. Para estas aves los ecosistemas de México son de importancia estratégica como sitios de paso en sus migraciones hacia el sur en el otoño y hacia el norte en la primavera.^{3,4}

Las aves acuáticas son un recurso de enorme importancia ecológica, cultural y económica del país. Uno de los acuerdos más importantes para mejorar la conservación y manejo de estas aves al igual que su hábitat ha sido el Plan de Manejo de Aves Acuáticas de América del Norte, compromiso de cooperación internacional.⁵

Las aves acuáticas migratorias llegan a nuestro país a los hábitats que se encuentran cubiertos temporal o permanentemente por agua conocidos como humedales, viéndose en la necesidad de convivir con asentamientos humanos, fauna silvestre y doméstica, esta interrelación de especies favorece la diseminación y transmisión de agentes infecciosos que pueden predisponer condiciones para la presencia de brotes infecciosos.¹

Los patógenos animales procedentes de la fauna silvestre han cobrado una importancia creciente en todo el mundo por los notorios efectos que tienen sobre la salud humana, la producción agrícola, las economías dependientes de la fauna silvestre y la protección de ésta.⁶

Las aves silvestres son importantes para la salud pública debido a que se ha comprobado que pueden llevar consigo infecciones zoonóticas emergentes, además pueden ser reservorios o dispersoras de artrópodos que sirven como vectores.⁷

Las enfermedades infecciosas emergentes no son accidentes, sino evoluciones esperando a ocurrir, debido a la expansión biótica, aunado a los patrones de distribución, junto a la capacidad de los microorganismos hacia la utilización de nuevos hospedadores, gracias a esto pueden dispersarse por los hospedadores desde sus áreas de origen.¹

Se menciona que las enfermedades emergentes o re-emergentes son enfermedades que resultan de los cambios en los microorganismos existentes a consecuencia de su evolución natural. Además, este concepto abarca la aparición de enfermedades que afectan a nuevos grupos poblacionales o los microorganismos adaptados a nuevos vectores. Además, los avances en el volumen y rapidez de la transportación poblacional, incrementan la oportunidad de enfermedades de emergentes o re-emergentes.^{1,9}

Los factores que determinan que especies pueden actuar como hospedadores durante una infección son varios. El contacto entre el hospedador y el patógeno son suficientes para que la infección ocurra. En las aves migratorias es de preocupación el transporte y la diseminación de ciertos microorganismos patógenos¹⁰ como ha sucedido en los países Asiáticos, en donde han ocurrido mortalidades en gallináceas, aves acuáticas (gansos, patos y cisnes) flamencos, garzas y gaviotas,¹¹ lo cual sería catastrófico para aquellas especies de animales que están amenazados por la extinción.

Los riesgos son todavía mayores si desconocemos la microflora residente de las aves silvestres.¹⁰ La diseminación de virus por las aves migratorias ha sido reportado varias veces.^{11-15,27-29,115}

Las aves acuáticas silvestres, particularmente las del género Anatidae, son el reservorio de todos los subtipos conocidos de orthomyxovirus tipo A y de ciertos tipos de paramyxovirus aviare.^{14,15,16} Estas poblaciones son consideradas los reservorios más importantes en la introducción de orthomyxovirus tipo A y de paramyxovirus aviare. Dentro de la industria avícola causan brotes de enfermedades con resultados devastadores, cuando se trata de líneas virales patogénicas.¹⁶

Los anátidos dependen de gran diversidad de humedales, desde la Tundra Ártica, ríos y estuarios, lagos de agua dulce o salada y pantanos hasta lagunas y áreas de costa como son las bahías. Estas poblaciones de anátidos migran entre humedales, en el norte entre sus áreas de reproducción y en el sur entre las áreas de descanso. La migración hacia el sur partiendo de las áreas de reproducción tiene comienzo en Julio y se incrementa a través de los meses siguientes. La mayoría de las aves regresan al norte a sus áreas de reproducción al final del invierno y comienzo de primavera. En el invierno de 2003-2004 cuando la mayoría de los brotes de influenza aviar ocurrieron en el sureste de Asia, fue cuando la densidad de las aves migratorias estuvo en su punto más alto, esto podría implicar a las aves silvestres como posibles fuentes de infección. Sin embargo algunos patrones de los brotes del virus de influenza altamente patógeno no coinciden con las rutas migratorias de las aves para todos los países.¹⁷

Para conocer la situación de los paramyxovirus y orthomyxovirus aviarios en las poblaciones de aves acuáticas es necesario realizar monitoreos, ya que estos virus pueden cambiar por recombinación o mutación entre las líneas que estén en circulación.¹⁶

En las aves acuáticas silvestres estos monitoreos han sido de gran ayuda en la predicción de nuevos serotipos del virus de influenza aviar en un área. En Siberia han proporcionado información temprana de una posible pandemia a futuro, debida al virus de influenza, con ello fue posible tomar acciones para la preparación de vacuna.^{19,20} Un mejor conocimiento de los patrones de migración y las enfermedades de las aves podría ser útil en ayudar a predecir futuros brotes, debido a enfermedades infecciosas emergentes.⁷

Los orthomyxovirus que han causado brotes a nivel mundial son clásicos ejemplos de virus emergentes que se mantienen en huéspedes animales antes de transmitirse al humano.⁹ Debido a que todos los subtipos de orthomyxovirus tipo A existen en las aves acuáticas, la influenza A no es una enfermedad radicable, por lo que la prevención y el control son objetivos fundamentales.¹⁸

En México, las ciénegas de Lerma proporcionan un lugar de estudio con características particulares muy propias, como son el tipo de vegetación, las especies de aves, las interacciones del hombre con el hábitat que lo hacen sitio ideal para el estudio de agentes infecciosos presentes en la fauna silvestre, que pudiera ser de algún peligro para el hombre, los animales domésticos, o para la misma fauna que ahí converge.

En particular, mediante la detección se pretende dar un primer paso en la investigación y creación de información de forma rápida y continua sobre la sanidad de las poblaciones de anátidos silvestres en México, además de tener en cuenta su importancia para la conservación y la regulación de las poblaciones de aves, con miras a desarrollar evaluaciones de riesgo, así como la preparación para mejorar la conservación de las aves acuáticas y el manejo de posibles brotes de agentes infecciosos.

Entender y definir las especies y poblaciones a monitorear es un punto clave que a nivel mundial esta discutiéndose, concentrarse en las aves normalmente asociadas con estos virus y considerar el conocimiento de las relaciones temporales y espaciales es de suma importancia para que a nivel mundial se generen mejores datos que permitan explicar el comportamiento de estos agentes.

Este estudio resulta fundamental para el conocimiento y evaluación de los orthomyxovirus y paramyxovirus dentro de las poblaciones silvestres de anátidos en México. Pero más que un reservorio en el sentido epidemiológico clásico, representan un depósito natural de un amplio conjunto de genes; un reservorio genético en el que existen frecuentes ocasiones para la recombinación genética, la diseminación por vía fecal y la difusión de los virus por todo el mundo. Además contemplando a las aves domésticas como un reservorio secundario relacionado con el anterior. La transmisión interespecies de los myxovirus es un hecho comprobado, pero la especificidad de especie es importante. Los fenómenos de sobrepoblación y falta de alimento, falta de cobertura de protección, fragmentación podrían exacerbar difusión de los virus, cuya existencia dentro de las poblaciones de anátidos de la Laguna de Chiconahuapan, en el Estado de México, esta siendo reportado aquí por primera vez a nivel nacional. Con la generación de estos datos se pretende desarrollar un mejor entendimiento de la existencia de patógenos y su interacción dentro de los hábitats acuáticos y la fauna silvestre que ahí habitan.

2. OBJETIVO.

Detectar orthomyxovirus y paramyxovirus aviareos en anátidos de la laguna de Chiconahuapan, Estado de México.

3. HIPÓTESIS.

En los anátidos silvestres de la Laguna de Chiconahuapan existen orthomyxovirus y paramyxovirus aviares.

4. JUSTIFICACIÓN.

Los monitoreos en animales silvestres proporcionan información oportuna de la presencia de patógenos y de enfermedades zoonóticas contribuyendo al conocimiento sobre las enfermedades que se encuentran o se intercambian geográficamente.

5. Antecedentes.

5.1 Myxovirus.

Myxovirus proviene del griego 'myxa' que significa mucus o mucosa

La característica propia de hemoaglutinación fue observada mediante el descubrimiento de que estos virus podían ser propagados en embriones de pollo. Los virus con estas propiedades similares fueron agrupados aquí hasta los años 70s en que se dividió en dos familias: orthomyxoviridae y paramyxoviridae.²¹

5.2 Orthomyxovirus.

En 1878 Eduardo Perroncito describió por primera vez una enfermedad en las aves domésticas que después de un tiempo se volvía altamente patogénica matando a todas las aves del área afectada.²² En 1974 Slemons *et al*, revelaron que el virus de influenza A de baja patogenicidad podría ser aislado de aves silvestres, debido a sus hallazgos al monitorear aves silvestres contra la enfermedad de Newcastle en California.²³ Posteriores análisis revelaron que las especies que vivían en ambientes acuáticos, como los patos, gaviotas, gansos y playeritos albergan líneas de virus de influenza A de baja patogenicidad, de diferentes subtipos y que probablemente actúan como reservorio de estas líneas.²⁴

Estudios posteriores han demostrado que los subtipos de influenza que infectan al humano y otros mamíferos originalmente circulaban en las poblaciones de aves silvestres.^{25,26}

5.2.1 Características del virus de Influenza Aviar.

El virus de la influenza aviar es un miembro de la familia *Orthomixoviridae* y del género *Influenzavirus A*. Una pared lipídica encierra un genoma de RNA de cadena simple, el cual se presenta en ocho segmentos o genes (PB1,PB2,M1,M2,NPHA,NA,NS). Los genes HA y el NA codifican para la proteína de hemaglutinina (HA o H) y la neuraminidasa (NA o N), respectivamente. En el virus de influenza aviar (por sus siglas en inglés AIV= avian influenza virus), se han encontrado 16 diferentes antígenos HA y 9 proteínas antigénicas diferentes para la NA; un virión puede llevar en su envoltura una de estas 16 HA y una de las 9 NA dando 144 posibles combinaciones.^{27,28, 29}

Los subtipos de los virus de influenza aviar, son identificados por la naturaleza antigénica de sus proteínas HA y NA. De los 16 subtipos del virus de influenza aviar, sólo los subtipos H5 y H7 de influenza aviar causan en las aves de corral alta patogenicidad; sin embargo la mayoría de los subtipos H5 y H7 son de baja patogenicidad. No obstante la preocupación es que estos subtipos H5 y H7 podrían cambiar debido a mutaciones en el gen HA y volverse altamente patógenos, estas características patobiológicas varían de acuerdo con la especie afectada y la cepa viral. Experimentalmente, los virus de influenza aviar de alta patogenicidad producen una grave enfermedad sistémica con alta mortalidad en las aves domésticas y otro tipo de gallináceas. Sin embargo, estos mismos virus usualmente no producen signos clínicos de infección o solamente una enfermedad leve en patos domésticos y otras aves silvestres.^{29,84}

5.2.2 Hospedadores.

Varios son los factores que determinan que especies de aves pueden actuar como hospedadores, siendo suficiente el contacto entre el hospedador y el patógeno para que la infección ocurra. Esto hace que algunas especies sean más fácilmente infectadas que otras. Desde el hecho de que la transmisión es principalmente a través del agua, las especies de aves acuáticas se han encontrado infectadas por virus de influenza A de baja patogenicidad más que las especies no acuáticas.²⁴ Por lo tanto los patos parecen servir como reservorios de la mayoría de los virus de influenza A incluyendo los subtipos de hemaglutinina y neuraminidasa de previas líneas pandémicas.²⁵ Los virus de influenza se replican preferentemente en las células del tracto intestinal de los patos y son excretados en altas concentraciones en las heces, contaminando fuentes de agua dando como resultado la infección de aves silvestres o aves domésticas. La recombinación genética entre dos diferentes virus de influenza aviar puede ocurrir en el tracto intestinal, esto explica parcialmente el ancho espectro de subtipos de virus de influenza que pueden ser aislados de estas aves acuáticas.

Dichas infecciones son asintomáticas y producen sólo una ligera respuesta de anticuerpos; sin embargo a pesar de esto, los patos pueden excretar el virus por un máximo de 14 días y ser inmunes a subsecuentes infecciones de influenza, por al menos 96 días después de la primera infección.^{26,12} En estos casos se cree que los virus de influenza que más fácilmente se adaptan a las poblaciones de aves son los que se replican más rápido, esto quiere decir, que el primer virus infectante podría prevenir el crecimiento de posteriores infecciones.¹²

Aunque se tiene establecido que las aves acuáticas son la fuente principal de virus de influenza A,²⁵ los virus predominantes, aun dentro de un mismo hemisferio, podrían diferir notablemente dentro de las aves huéspedes ya que usan diferentes rutas migratorias, dando como resultado diferentes subtipos de hemaglutininas y neuraminidasas que prevalecen en Norteamérica y otros en Euroasia.²⁷

Debido a que los brotes de influenza altamente patógena que ocurren en la avicultura comercial, encuentran su origen en virus de influenza de baja patogenicidad presentes en las aves acuáticas, el monitoreo de virus en las poblaciones de aves silvestres podría funcionar como un sistema de alarma temprano y podría proporcionar información a través de caracterizaciones genéticas de los virus aislados en América y Euroasia, estando preparados a brotes relevantes para la salud pública y animal.²⁸

Por ejemplo, en Italia, el monitoreo de los virus de influenza aviar en los anátidos silvestres, demostró que los virus de influenza aviar circulan frecuentemente entre este tipo de aves durante todo el año.²⁹ Por otro lado, en Alaska mediante el monitoreo se ha observado que ocurre una alta incidencia de virus infectantes para los patos dentro de sus lugares de reproducción.¹³

La aparición de virus virulentos por mutación de las líneas existentes de baja patogenicidad se ha asociado a brotes de influenza aviar de alta patogenicidad en aves de corral debido a los virus de subtipo H5 de 1983-84 en Pennsylvania, E.U.A. y en 1994-95 en México.³⁰ Anualmente las epidemias son debido al cambio del antígeno y las pandemias, ocurren en intervalos de 10 a 50 años debido a los nuevos subtipos de virus resultantes de la recombinación genética del virus.^{31,114}

A nivel mundial, hay reportados 18 brotes de influenza de alta patogenicidad, entre 1959 y 1999. Nueve debido al subtipo H5 y nueve al H7,³² en donde en Hong Kong la transmisión directa de aves a humanos ocurrió durante brotes en aves.³³

La prevalencia de los subtipos del virus de influenza aviar en las aves acuáticas varía por la edad, temporada y especies. La edad parece ser el primer factor de riesgo para la infección de influenza aviar. Las proporciones de prevalencia en juveniles han sido significativamente mayores que las proporciones de prevalencia en aves adultas. Típicamente se encuentra que las aves juveniles residentes son infectadas alrededor de Julio a Noviembre, cuando las aves migratorias se congregan para la migración en Norteamérica. Las especies *Anas platyrhynchos* y *Anas discors* son las que se notifican con mayores proporciones de prevalencia del virus dentro de las poblaciones de aves acuáticas.³⁴⁻³⁷

5.2.3 Transmisión.

Debido al hecho de que se piensa que la transmisión es principalmente a través del agua, las especies de aves acuáticas se han encontrado infectadas por virus de influenza A de baja patogenicidad mas que las especies no acuáticas.²⁴

Los virus de influenza A no se replican fuera de las células del hospedador, así que para infectar nuevos individuos necesita permanecer durante algún tiempo en el medio ambiente. Se ha visto que el virus de influenza A está bien adaptado para persistir en el agua. Sin embargo, bajo condiciones naturales, la persistencia de un virus activo está limitada por los efectos de pH, salinidad, radiación UV y la presencia de material biológico como son las bacterias, enzimas degradadoras y otros microorganismos.^{38,39}

5.3 Paramyxovirus.

Los virus de la familia *Paramyxoviridae*, forman parte del orden *Mononegavirales*. La taxonomía y nomenclatura de la familia *Paramyxoviridae* fue modificada en el séptimo reporte del Comité Taxonómico Internacional de Virus en el año 2002 y se divide en dos subfamilias. La subfamilia *Paramyxovirinae* que tiene tres géneros donde el virus de la enfermedad de Newcastle (Por sus siglas en inglés NDV = Newcastle Disease Virus) pertenece al género *Avulavirus*. Recientes trabajos que involucran la secuenciación genómica del virus de la enfermedad de Newcastle sugieren que los paramyxovirus aviares son suficientemente diferentes de otros *Avulavirus* para garantizar que estén en otro grupo aparte.⁴⁰

5.3.1 Características del virus de Newcastle.

Los viriones de los paramyxovirus son pleomórficos, con partículas envueltas cuya membrana esta modificada con dos y a veces tres proteínas de transmembrana y una proteína M que da línea a la superficie de la membrana. El centro del virus incluye un genoma de RNA de cadena simple de 15 a 19 kb y proteínas asociadas, la proteína de la nucleocápside (NO), la fosfo-proteína (P) y el virión asociado a la polimerasa (L).⁴¹ Además la glicoproteína viral que se proyecta desde la superficie es la proteína de fusión (F), la cual es responsable de la fusión de la membrana y la unión con la respectiva proteína receptora.⁴² La glicoproteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) en la superficie del virus regula la unión del virus al receptor de la célula del hospedador y la actividad de neuraminidasa. Así la habilidad del virus de NDV de aglutinar eritrocitos es debido a la unión de la proteína HN a los receptores de la superficie de los eritrocitos.⁴³

5.3.2 Hospedadores.

En la literatura existen reportes de paramyxovirus aislados de varias especies de aves de diversas áreas. Son nueve los diferentes serotipos, designados PMV-1 a PMV-9, que actualmente se reconocen.^{44,45} El serotipo 1 representado por el virus de la enfermedad de Newcastle, principal amenaza a la avicultura de todo el mundo, causa altas mortalidades.⁴⁶

Los paramyxovirus aviares que circulan en las aves acuáticas se replican en el tracto intestinal del hospedador, el cual elimina el virus a través de las heces, quedando estable en el agua. Análisis del genoma de los virus muestran la posibilidad que la mayoría de los patos, podrían estar infectados antes o después de sus migraciones.⁴⁷

Kaleta y Baldauf (1988) mencionan los registros en 27 ordenes de aves, donde la infección con virus de Newcastle se puede dar de manera natural o experimental, además sugirieron que es probable que todos los géneros de aves puedan ser susceptibles a la infección.⁴⁸

Aunque se conoce muy poco acerca de los paramyxovirus aislados de las poblaciones de aves acuáticas silvestres, se sabe que estos virus muestran un carácter de avilurencia⁴⁹ dentro de las poblaciones de anátidos silvestres con el potencial de ser altamente virulentos. Sin embargo campañas de monitoreo no se llevan a cabo en varios países, por lo cual muchas especies silvestres no están siendo monitoreadas; así que no hay información epizootiológica disponible que nos proporcione una visión de la ecología natural de estos virus.⁴⁴ Es necesario la investigación que genere información de estos virus y su potencialidad patogénica a las aves silvestres.⁵⁰

Varias especies de anátidos han sido seropositivos a diferentes tipos de paramyxovirus y la dispersión dentro de las poblaciones de anátidos podría ser mediante formas de infecciones no patógenas, lo cual demostraría la importancia del papel de estas especies en la epizootiología dentro de los paramyxovirus.⁵¹ Se ha documentado la aparición de tipos virulentos de la enfermedad de Newcastle a partir de virus no patogénicos mantenidos en aves silvestres.⁵²

Las mutaciones dentro de estos virus podrían jugar un papel importante en la aparición de enfermedades infecciosas. No es muy claro como o donde tienen lugar estas mutaciones, aunque si pudieran o no ocurrir, es probable que sea propiciado debido a las fuentes genéticas de estos virus (aves de corral y aves silvestres) y el estado de salud de las aves.¹⁶

Se ha demostrado infecciones simultáneas en aves domésticas y aves silvestres por dos diferentes líneas de paramyxovirus. El principal hecho es que durante los pases de dichas infecciones dobles, la enfermedad del virus de Newcastle es prevalente. El hecho de infecciones combinadas en aves por dos serotipos de paramyxovirus aviáres refleja una manera importante la epizootiología y patogénesis de las causas de enfermedad de los paramyxovirus aviáres.⁴⁶

El virus de la enfermedad de Newcastle con un amplio rango de patogenicidad y virulencia ha sido aislado de una variedad de especies de aves silvestres y domésticas alrededor del mundo.^{52,53,54} Este virus está clasificado en tres categorías, las cuales son: altamente patogénico (velogénico), moderadamente patogénico (mesogénico) y de baja patogenicidad (lentogénico).^{55,56}

Toyoda, *et al* (1989), mencionan que la evolución del paramyxovirus Tipo 1 ha sido un proceso lento, dependiente de la acumulación de mutaciones de punto que inducen la sustitución de aminoácidos.⁵⁷ Por lo tanto se sugiere que la presión selectiva del sistema inmune del hospedador refuerza el proceso evolutivo del virus de la enfermedad de Newcastle.⁵⁸ Cercana similitud genética proporcionaría evidencia para un vínculo epidemiológico entre distintos brotes,⁵⁹ por ejemplo los análisis genéticos de estos virus aislados durante los brotes de 1998-2000 en Australia sustentan esta hipótesis.⁶⁰ Sin embargo, se requiere aún de soporte sobre la posibilidad de que los virus avirulentos llevados por aves silvestres puedan adquirir alta virulencia por mutación, ya que no está muy claro cuando y donde la adquisición de la virulencia toma parte en las poblaciones de aves silvestres, con la subsecuente introducción del virus virulento dentro de la avicultura; o al contrario, es decir, cuando un virus avirulento es transmitido directamente a los pollos y dentro de estas poblaciones se vuelve virulento.

Por otro lado, en Irlanda en 1990, hubo dos brotes de enfermedad de Newcastle, el virus aislado fue velogénico muy similar antigénicamente y genéticamente a los virus avirulentos normalmente aislados de anátidos silvestres.⁶¹ La poca distinción genética de este grupo de virus comparado con todos los otros, sugiere que los virus velogénicos surgieron de tipos avirulentos originados en aves silvestres.⁶² Zannetti, *et al* (2005), ponen de manifiesto que existen ecosistemas que son importantes para la transmisión intra e inter de los virus aviares, como lo confirman hábitats de Europa del Oeste.⁵²

5.3.3 Transmisión.

Las diferencias en la especificidad del receptor entre tipos a partir de una variedad de especies de aves no han sido sistemáticamente investigadas. Se ha demostrado que virus presumiblemente introducidos de anátidos silvestres dentro de la población de pollos se vuelven virulentos después de repetidos ciclos de replicación. Por lo tanto se piensa que el virus de la enfermedad de Newcastle de los pollos fue originalmente derivado del que se mantiene en las aves silvestres. Takakuwa, *et al* (1998), sugieren que líneas potenciales virulentas de NDV son mantenidos en las poblaciones de anátidos migratorios en la naturaleza.^{49,112}

Sin embargo las bases moleculares de transmisión de los virus de los anátidos silvestres a los pollos permanecen sin aclararse.

El primer paso de la infección del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) es la unión del virus a los oligosacáridos en la superficie de la célula del hospedador; en este caso ITO, *et al* (1999), mencionan que cuando el NDV originado de las aves silvestres puede unirse a las células de los pollos existiría un determinante clave para la transmisión de las aves silvestres a los pollos.⁴³

En 2000, Shengqing, *et al*, aislaron cinco virus lentogénicos de la enfermedad de Newcastle de gansos de frente blanca, y menciona la existencia de posibles precursores de myxovirus aviáres de alta patogenicidad llevados por las aves migratorias.⁶³

De hecho experimentalmente se ha demostrado que los virus avirulentos, mantenidos en la naturaleza por los anátidos, tienen el potencial de volverse altamente patogénicos después de la transmisión y circulación en las poblaciones de pollos, causando brotes con altas mortalidades.^{60,64}

Por lo tanto estos resultados soportan la continua vigilancia de las poblaciones de aves silvestres, que debería ser parte integral de políticas de control para estas enfermedades que son muy serias para la avicultura.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Área de estudio: Laguna de Chiconahuapan (latitud 19.1422 y longitud 99.5021) (Anexo 1; Mapa 1).

En el altiplano central de la República Mexicana perteneciente al Estado de México se tiene uno de los humedales centrales del país más importantes considerado como área de importancia para la conservación de las aves, las “Ciénegas de Lerma”.

Como parte de este grupo de ciénegas, la laguna de Chiconahuapan es uno de los tres cuerpos de agua con mayor superficie, con alrededor de 800 hectáreas disponibles para la llegada de aves acuáticas.

Dentro de la laguna de Chiconahuapan se ubica una Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA registro DGVS-CR-EX0681-MEX) que mantiene una actividad cinegética dentro de 357.2 hectáreas aproximadamente (Anexo 1; Mapa 2).

Esta laguna está compuesta por un sistema de ciénegas tulares y áreas sujetas a la inundación incluyendo tierras dedicadas al cultivo y a la ganadería. Con un clima templado sub-húmedo con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 11.5°C.

6.2 Animales.

Dentro del grupo de los anátidos, esta área de estudio registra una especie residente (*Anas platyrhynchos diazi*) y seis especies de aves migratorias (*Anas acuta*, *Anas crecca*, *Anas discors*, *Anas clypeata*, *Anas cyanoptera* y *Anas americana*)

Estas diferentes especies de aves son las que se pretenden monitorear durante la temporada cinegética, realizando tomas de muestras de las aves producto de la cacería. Permiso de colecta científica DGVS/07165 (Anexo 2).

6.3 Etapas del Estudio.

El estudio se llevó a cabo en diferentes etapas que son las siguientes:

Etapa 1. Se recolectó mediante hisopos estériles de algodón muestras de exudados de cloaca y tráquea^{54,28} de 231 individuos de siete especies diferentes de anátidos de la Laguna de Chiconahuapan, Estado de México (Anexo 3).

El transporte de las muestras se realizó en tubos que contenían 5ml de medio esencial mínimo (Dulbecco's Modified Tagle médium, Gibco BRL , Life Technologies) (Anexo 5) con un pH de 8.5, con 1% de antibiótico (Gibco Antibiotic-Antimycotic, penicilina G sódica 10,000 unidades/ml, sulfato de estreptomycin 10,000µg/ml y amfotericin B 25µm/ml como fungicida en .85%) y transportados a 4°C.⁶⁵

Etapa 2. Procedimiento de las muestras en laboratorio (Anexo 4).

Homogenizados

Se homogenizaron las muestras de cloaca de 4 patos del mismo sexo y especie, de la misma manera se procedió con las muestras de tráquea.

Las muestras de las aves se procesaron a través de una membrana de 0.45µm (Durapore Membrana Filtres, Millipore) y un prefiltro de 25mm (Millipore) para la eliminación de partículas contaminantes.

Pruebas Biológicas. Aislamiento e identificación viral.

Se llevó a cabo la inoculación de embriones de pollo de 9 días de edad SPF Tipo II (ALPES, Grupo IDISA) ya que es un método sensible para el aislamiento de virus aviares.^{40,47,66-70} Para esto se usaron jeringas de insulina (1ml calibre 27) inoculando por cavidad alantoidea, 0.2ml de los homogenizados en cada embrión (6 a 9 embriones por homogenizado) (Anexo 3).

Los embriones inoculados se incubaron a 37.7°C (Incubadora Jamesway s/n). A las 24hrs post-inoculación se revisó la mortalidad mediante ovoscopia, atribuyéndose cualquier mortalidad dentro de este margen a contaminación bacteriana o mal manejo del embrión.

A las 48 hrs. post-inoculación se revisó nuevamente la mortalidad de los embriones y se recolectó líquido alantoideo del 50% de los embriones inoculados, el cual se almacenó en viales estériles de vidrio, para realizar prueba de hemoaglutinación en placa. El restante 50% de los embriones continuaron en incubación.

Prueba de hemoaglutinación en placa. Se lleva a cabo mediante la colocación individual de 1ml de cada pool en una placa de acrílico. Posteriormente se le añade a cada uno de los mililitros representativos de los pools 0.2ml de glóbulos rojos al 2% de pollos (*Gallus gallus*) (Anexo 4.1 y 4.2).

Almacenamiento: Todas las muestras son almacenadas en viales y congeladas a -70°C (Congelador modelo American, SN190)

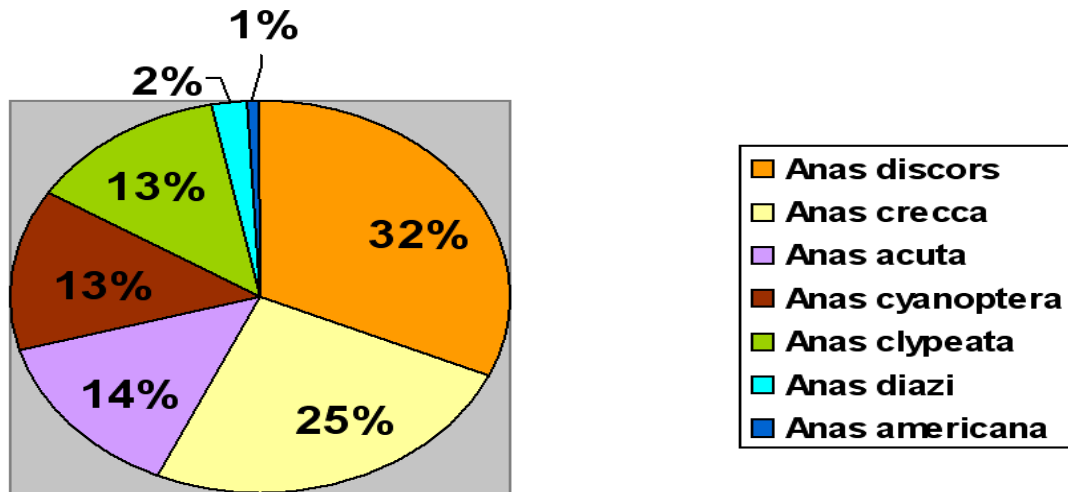
7. RESULTADOS.

En el cuadro 1 se puede apreciar las siete especies diferentes de anátidos muestreados y el número de individuos de cada una de las especies. El mayor número de muestras correspondió a la cerceta de alas azules (*Anas discors*) con 73 individuos, lo cual representó un 31.6%, le sigue la cerceta de alas verdes (*Anas crecca*) con 58 (25.1%), el pato golondrino (*Anas acuta*) 32 individuos (13.85%), cerceta canela (*Anas cyanoptera*) con 31 (13.41%), a continuación el pato cucharón (*Anas clypeata*) con 30 (12.98%), pato mexicano (*Anas diazi*) con 5 (2.16%) y finalmente pato panadero (*Anas americana*) con 2 individuos representando el .86% de un total de 231 individuos (Gráfico 1).

Cuadro 1: Cantidad de especies monitoreadas durante la realización del estudio, durante la temporada cinegética 2005-2006, en La Laguna de Chiconahuapan, Estado de México.

Nombre común	Nombre científico	No. Individuos
Ala azul	<i>Anas discors</i>	73
Alas verdes	<i>Anas crecca</i>	58
Golondrino	<i>Anas acuta</i>	32
Canela	<i>Anas cyanoptera</i>	31
Cuchara	<i>Anas clypeata</i>	30
Mexicano	<i>Anas diazi</i>	5
Panadero	<i>Anas americana</i>	2
	TOTAL	231

Gráfico 1. Composición porcentual de las especies monitoreadas, durante la temporada cinegética 2005-2006, en La Laguna de Chiconahuapan, Estado de México



En el cuadro 2 se muestran los dos aislamientos virales logrados en el mes de Febrero durante el monitoreo de la temporada de cacería 2005-2006. El primero de los aislamientos virales pertenece a un homogenizado de anátidos de cerceta canela (*Anas cyanoptera*), el cual corresponde a un orthomyxovirus (virus de influenza aviar tipo A) H7N3 de baja patogenicidad, resultado generado por la genotipificación hecha por la Comisión México Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA) (Anexo 6). El segundo aislamiento viral correspondió a un paramyxovirus tipo 1 (Enfermedad de Newcastle) de un homogenizado de anátidos de cerceta de alas azules (*Anas discors*).

Cuadro2: Aislamientos virales durante el monitoreo de la temporada de cacería 2005-2006, en la laguna de Chiconahuapan, Estado de México.

Animal		Sexo	Mes	Aislamiento viral
Nombre científico	Nombre común			
<i>Anas cyanoptera</i>	Cerceta canela	Macho	Febrero	Virus de influenza tipo A subtipo H7N3 de baja patogenicidad.
<i>Anas discors</i>	Cerceta de alas azules	Macho	Febrero	Virus de la enfermedad de Newcastle

8. DISCUSIÓN.

8.1 Orthomyxovirus

Se realizó por primera vez en México un aislamiento viral de un virus de influenza A subtipo H7N3 de baja patogenicidad, a partir de poblaciones de anátidos silvestres. En este caso fueron anátidos de la especie de *Anas cyanoptera* o cerceta canela, misma especie de anátido que ha sido reportado con H7N3 de baja patogenicidad en Bolivia en el 2001.⁷¹

La prevalencia de virus de influenza aviar se encuentra en patos de collar (*Anas platyrhynchos*) y en cercetas principalmente, por ejemplo otras especies de anátidos en donde se ha aislado el subtipo H7N3, se encuentra la cerceta de alas verdes (*Anas crecca*) 2001, cerceta de alas azules (*Anas discors*) 2001, 2002 en Texas, pato de collar 2002 en Italia y en Irán 2004. De forma general se menciona que la prevalencia del subtipo H7 en anátidos silvestres se encuentra en un 11.1% y de la N3 del 10.2%.¹¹⁷ En este estudio, el aislamiento del subtipo H7N3 de baja patogenicidad, significó el 12.9% del total de individuos de cerceta canela (*Anas cyanoptera*).

Los subtipos H7 de baja patogenicidad, han demostrado que tienen la capacidad de mutar a virus de influenza de alta patogenicidad.⁷² Esta característica la han demostrado principalmente cuando entran en circulación con las aves domésticas, principalmente en pavos,⁷⁷ llegando a causar severas pérdidas económicas en la industria avícola, tal es el caso del virus de baja patogenicidad H7N3 que causó un brote en Norfolk, Inglaterra, en granjas comerciales, por falta de las medidas de bioseguridad adecuadas.⁷³

Senne D. (2007) menciona que han ocurrido dos brotes de virus de alta patogenicidad de influenza aviar en aves comerciales en el continente americano, teniendo los precursores virales en anátidos silvestres: Un brote en Chile (H7N3)(*Anas clypeata*) en el año 2002, uno en Canadá (H7N3) (*Anas platyrhynchos*) en 2004. Todos los demás reportes de infección en aves comerciales y los aislamientos de aves silvestres pertenecen a virus de influenza aviar de baja patogenicidad.⁷⁴

De forma natural la infección con virus de influenza A en los patos de superficie (pato de collar y cercetas), generalmente no provoca signos clínicos, esto podría explicarse porque estas aves producen una respuesta humoral baja transitoria, que es suficiente para proporcionar protección parcial contra reinfecciones homologas, pero no confieren protección contra subtipos heterólogos.¹¹⁸ Por lo tanto, diferentes subtipos de virus de influenza pueden infectar a los patos simultáneamente creando la posibilidad para una recombinación genética.¹²

Las cercetas son de las pocas especies norteamericanas que mas abundan y tienen distribución invernal, incluyendo partes de Sudamérica. En México esta especie convive con otros anátidos que podrían servir de hospedadores para el virus de influenza.

Como se ha visto el virus de influenza aviar es el más diverso entre las aves y particularmente en las aves acuáticas. En México, con este subtipo H7 aislado, se corre el riesgo, al igual que en otras partes del mundo, de provocar severos brotes en aves comerciales, si llegara a entrar en contacto con aves domésticas podría presentar una rápida evolución^{24,72} logrando mutar a alta patogenicidad.⁷⁶

Además los subtipos H7 están relacionados con enfermedad en humanos, siendo el reporte más notable la infección confirmada de 89 personas en los países bajos.⁷⁶⁻⁷⁸ Por lo tanto existe la preocupación de que brotes de influenza aviar en aves puedan introducir nuevos subtipos de influenza dentro de la población humana, a través de un proceso de recombinación genética, mutación o ambos.^{78,79}

Actualmente el conocimiento de los diferentes subtipos virales en estas aves, muestran cambios estacionales y fluctuaciones entre años en la prevalencia y distribución de subtipos. En México, el aislamiento viral de influenza aviar realizado en esta tesis fue a finales del invierno, por lo que resulta diferente a lo reportado por Wallensten, *et al* (2007), para el norte de Europa, ya que ellos encuentran una mayor prevalencia en primavera.⁸⁰ Por lo tanto en México debe continuar su vigilancia anual para reconocer los meses de mayor prevalencia viral. Además hay que tener presente los patrones de especies de aves migratorias que son predominantes, ya que aunque hay algunos movimientos de virus entre Eurasia y América, esta migración por las diferentes especies de aves, no es muy extensivo.⁸⁵

Con respecto al virus de influenza A se reporta la diversificación de dos linajes separados, el Norteamericano y el Euroasiático.¹¹³ Aunque Spackman, *et al* (2007), mencionan la posible existencia de un tercer linaje, el sudamericano.⁸¹ En estudios posteriores se recomienda confirmar la pertenencia del H7N3 de baja patogenicidad aislado en este trabajo con estos linajes reportados.

Los virus pueden establecer infecciones sistémicas tanto en los patos jóvenes como en los mayores, con replicación viral en tejidos. Las diferencias en la patología que reportan entre patos silvestres infectados aún no está muy clara y se menciona que esta relacionado con una variedad de factores incluyendo la cepa, la repuesta inmune del huésped, el grado de madurez de las células del huésped y la capacidad de sustentar la replicación del virus.⁸⁴ Por ejemplo la alta letalidad para los patos está inversamente relacionada con la edad, a diferencia de que en otras especies aviares son altamente patógenos a cualquier edad.^{84,85}

En México, posiblemente la transmisión oral-fecal del virus de influenza aviar, puede darse por medio del agua contaminada ya que ha sido un mecanismo reconocido de transmisión entre poblaciones silvestres de aves acuáticas. Aunque hay que tener presente que las rutas de excreción primaria pudieran cambiar según el subtipo de virus de influenza aviar que se trate.^{86,88}

Aun se conoce muy poco de la persistencia viral en el medioambiente, pero se sabe, que los virus de baja patogenicidad de influenza aviar son sumamente estables en el medio ambiente acuático dulce, donde pueden permanecer por más 100 días a 28°C,⁸⁷ y estas condiciones las cumple completamente las ciénegas de Lerma, en el Estado de México.

Brown, *et al* (2007), mencionan que los orthomyxovirus pueden llegar a adquirir propiedades que les permite una alta estabilidad medio ambiental y que estas propiedades podría ser un factor de riesgo más para la transmisión de virus a través de aguas no tratadas para las personas y la avicultura.^{87,89}

La persistencia de los virus de influenza aviar H7 es inversamente proporcional a la temperatura y salinidad del agua. Además de que persisten por más tiempo los virus de influenza aviar de baja patogenicidad,^{38,39,89} por tales condiciones, es congruente el aislamiento del subtipo H7N3 de baja patogenicidad en México dada las condiciones medioambientales que

caracterizan a las ciénegas de Lerma. Hay que tener presente que el H7N3 de baja patogenicidad se conoce como uno de los subtipos que más fácilmente se adaptan a las poblaciones de aves acuáticas.¹²

Por último es necesario el continuo monitoreo anual, para dilucidar la presencia de más subtipos virales presentes en las ciénegas de Lerma. Esto es principalmente en los hábitats de agua dulce que son de importantes para la biología de las especies de aves acuáticas silvestres, para ayudar a contribuir al entendimiento de los virus de influenza aviar en el medio ambiente, incluyendo el mecanismo y determinantes moleculares de la persistencia viral.

8.2 Paramyxovirus.

En México, por primera vez se aisló un PMV-1 en anátidos silvestres. El aislamiento se obtuvo a partir de hisopo de tráquea y cloaca de una cerceta ala azul (*Anas discors*) en las ciénegas de Lerma. La presencia de este tipo de virus en patos silvestres es considerada normal, debido a que hay anticuerpos séricos en patos⁹⁸ y que es el virus dominante dentro de los diferentes serotipos de paramyxovirus aviáres comúnmente encontrados en patos y gansos silvestres.^{90-92,103} También existen reportes de la presencia de PMV-1 en aves zancudas.¹⁰⁷

El PMV-1 se ha aislado de la mortandad de cercetas de la verde (*Anas crecca*) en Irán,⁹³ y de gansos en China.⁹⁴ Sin embargo, no se evidenciado que hayan muerto por el virus. Lo que mantiene la idea de que este virus es inocuo para anátidos silvestres. Lo anterior se ha demostrado en estudios de laboratorio, donde PMV-1 altamente patógeno para pollos domésticos, no causa enfermedad en pato de collar (*Anas platyrhynchos*) y ganso canadiense (*Branta canadensis*) y su excreción por heces fue casi nula.^{104,105}

El PMV-1 puede tener tres presentaciones de acuerdo al tiempo en el que mata a los embriones de pollo. Estos puede ser: 1) velogénico, 2) mesogénico, y 3) lentogénico.^{40,96,97} En patos silvestres y domésticos el PMV-1 comúnmente aislado es lentogénico.⁹⁸⁻¹⁰⁰ En este estudio se observó que le PMV-1 aislado de la cerceta ala azul es lentogénico debido a que no mató a los embriones de pollo. Sin embargo, esta documentado que algunos PMV-1 provenientes de patos silvestres clínicamente sanos pueden desarrollar patogenicidad para los pollos comerciales, cuando se adaptan al embrión de pollo.⁶⁴ La presencia de una fenilalanina en la posición 117 de la hendidura F del PMV-1 ha mostrado que aumenta la virulencia.⁵²

La prevalencia de PMV-1 en poblaciones de anátidos silvestres de Estados Unidos y Canadá oscila entre el 1 al 3% en la época invernal,^{53,91,92} mientras que en Japón, la prevalencia es del 2%.^{101,102} En este estudio, el aislamiento del PMV-1 significo el 1.7% del total de la población.

El porcentaje de prevalencia más alto ha sido reportado en juveniles de cercetas de ala azul con un 9% en septiembre en los Estados Unidos,³⁷ contrario a lo encontrado en este estudio, que fue del 5.4% en el mes de febrero.

La detección del PMV-1 en febrero y no en los meses previos a la migración podría asociarse a la falta de alimento y al hacinamiento previo a la migración como se ha reportado en otros países.¹¹⁶ También la participación de otras especies de aves como la gallareta (*Fulica americana*) participarían en la mantenimiento del virus.^{98,106} La detección de un solo PMV-1 en cercetas silvestres migratorias en el mes de febrero, podría deberse a que se tomaron pocas muestras del total de la población.

En este estudio no se encontró una gran variedad de subtipos ni para los virus de influenza aviar, ni para los virus de Newcastle, pero se observaron particularidades muy similares a otros estudios realizados en Norteamérica,^{50,53,98} en donde la prevalencia viral se encontraba siempre mayormente en los patos de superficie, y en hábitats de agua dulce, pero las características propias que distinguen a las Ciénegas de Lerma como son la descarga de contaminantes, la congregación de los animales, etc lo hacen un sitio para posteriores estudios de monitoreo, que pudiera explicar la existencia o no, de otros subtipos virales, su linaje a nivel mundial y la forma de perpetuación dentro de los humedales mexicanos, porque, Zannetti, et al, 2005, sugiere que el medio ambiente y las condiciones sanitarias al igual que las especies involucradas juegan un papel importante en la prevalencia del virus.⁵²

9. CONCLUSIONES.

La presencia de orthomyxovirus y paramyxovirus en La laguna de Chiconahuapan, en el Estado de México es confirmada en este estudio mediante el logro de aislamientos virales, siendo el primer reporte en el país.

Por lo tanto es posible encontrar estos agentes virales en el territorio nacional en humedales de agua dulce que presenten las mismas condiciones que las ciénegas de Lerma.

La identificación de los virus presentes en México permitirá contar con elementos para una mayor comprensión de la ecología y epidemiología de los agentes virales en forma natural.

10. RECOMENDACIONES.

1.- Es importante muestrear poblaciones de anátidos silvestres dentro del país en los humedales donde se concentren un mayor número de estos, además de obtener un número mayor de muestras de todas las regiones de forma representativa del país.

2.- Incluir pruebas moleculares para saber la relación que guardan filogenéticamente las líneas presentes en el país con el resto del mundo.

3.- Abarcar en el monitoreo a las aves charadriiformes siendo especies reservorio como lo reportan varios autores, para corroborar o descartar la existencia de virus y la participación de este tipo de aves en la perpetuación de los orthomyxovirus y paramyxovirus dentro del país.

4.- Comprobar si existen más tipos de orthomyxovirus y paramyxovirus dentro de las poblaciones de aves acuáticas.

5.- Es necesario seguir el monitoreo y comparar los datos mediante un sistema de vigilancia a largo plazo en las poblaciones de anátidos silvestres, junto a sus patrones de distribución geográfica y modos de perpetuación del los virus en las poblaciones de aves

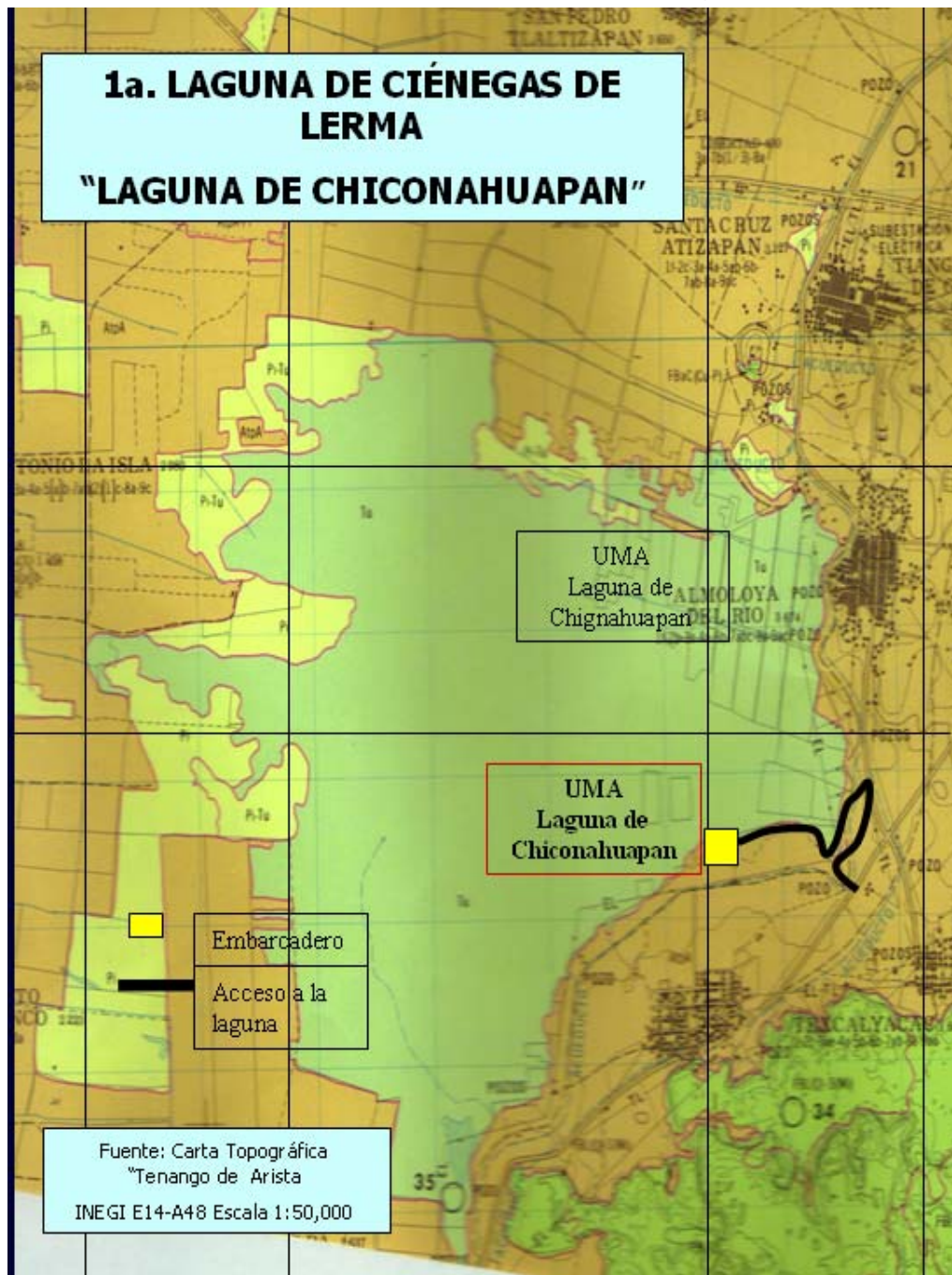
6.- Es importante también el estudio de la epizootiología de estos virus en las poblaciones de patos, junto con la interacción hombre animal, para comprender mejor la situación de persistencia de estos virus en los humedales de México.

11. Anexos

11.1. Anexo 1.

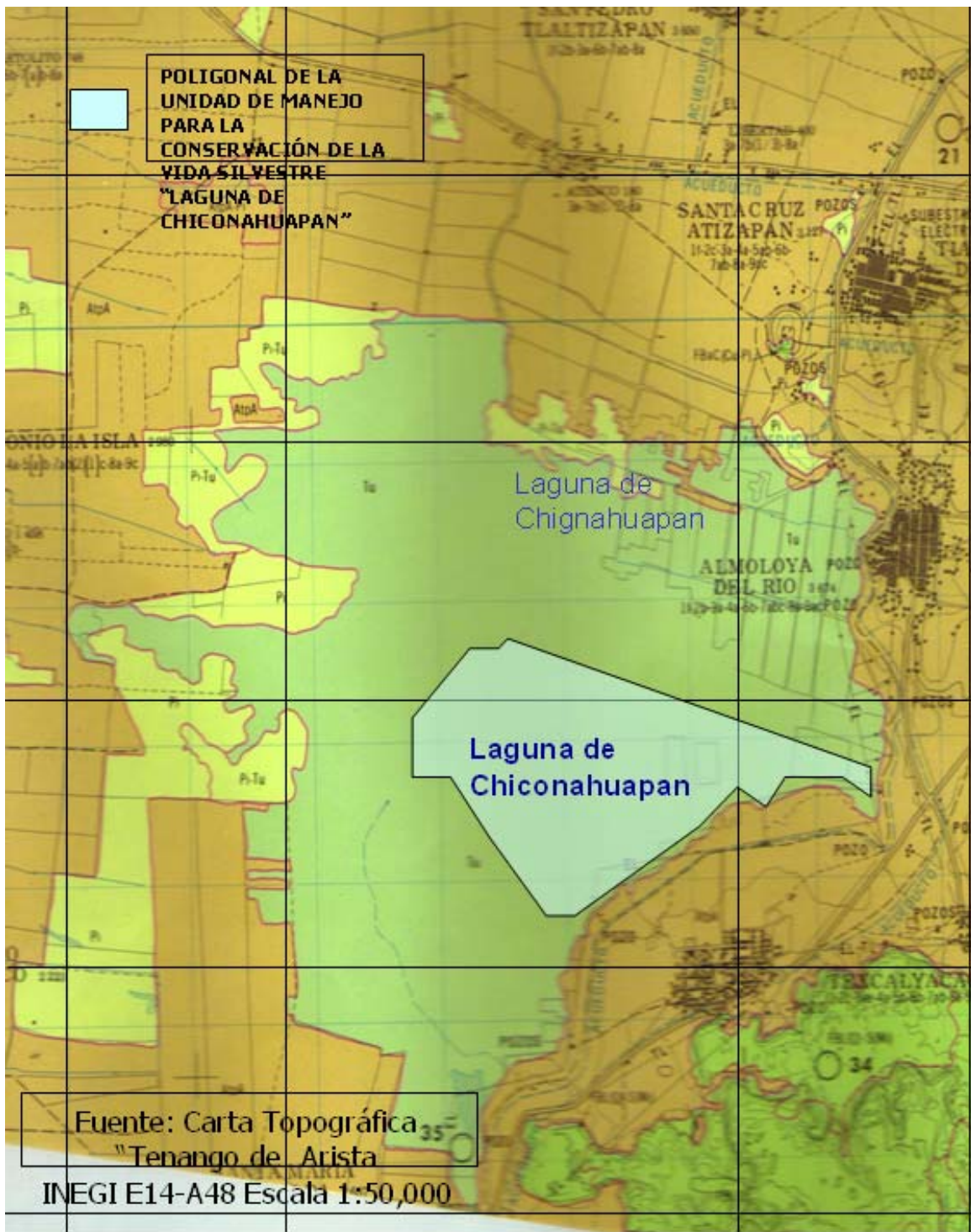
MAPA 1.

LOCALIZACION DE LA UMA latitud 19.1422 y longitud 99.5021




Mapa1. Localización de La Laguna de Chiconahuapan, Almoloya del Río, Estado de México.

MAPA 2.



Mapa2. Área de la UMA que representan 357.6 hectáreas

11.2 Anexo 2.


SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE
AV. REVOLUCIÓN No. 1425,
COL. TLACOPAC,
DELEG. ÁLVARO OBREGÓN
01040-MÉXICO, D. F.

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 07165
MÉXICO, D. F., A 06 JUL. 2005

MVZ. EDGAR ARTURO CUEVAS DOMÍNGUEZ
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CIRCUITO EXTERIOR S/N, C. U.,
04510, COYOACÁN, MÉXICO, D. F.
TEL. 2158 5852
cuevasedgar@yahoo.com.mx

Considerando que ha dado cumplimiento a los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestres en territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32 Bis fracciones I, III, V, XXII, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículos 5 fracción XI, 79, fracciones I, II, III, VI y VII, 80 fracción I, 82, 83 y 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículo 31, fracción VI del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Artículos 1º, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre; Título Sexto, Capítulo I, Artículo 85, fracciones I, II, III, IV, V y VI, Capítulo II, Artículo 88, fracciones I, II y VI, Capítulo IV, Artículo 105, fracciones II y III del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas (ANP's); las disposiciones relativas de la Norma Oficial Mexicana NOM-126-SEMARNAT-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional; la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo, la Dirección General de Vida Silvestre **autoriza** la captura, toma de datos, toma de muestras de hisopos (cloaca y faringe), colecta de plumas primarias y liberación inmediata del número de ejemplares que se consideren necesarios del grupo de aves. Las actividades se llevarán a cabo en los Lagos de Texcoco, Guadalupe y Xochimilco pertenecientes al Valle de México. **No se autorizan la colecta de especies listadas en la NOM-059-SEMARNAT-2001, ni las actividades dentro de Áreas Naturales Protegidas.** Esta autorización tendrá una vigencia a partir de la fecha de expedición de la presente y hasta el 30 de junio del año 2006.

La presente se expide en apoyo a las actividades inherentes al desarrollo del proyecto "**Determinación de virus en aves migratorias ubicadas en los humedales del Estado de México, a través de hisopos de cloaca y faringe**", que llevará a cabo la Universidad Nacional Autónoma de México, **debiendo sujetarse obligatoriamente a las siguientes condiciones:**

1. - Tomando en consideración lo establecido por el Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y por el Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, el titular de la presente deberá contar con la autorización expresa de los legítimos propietarios de la(s) tierra(s) donde pretende desarrollar el proyecto.
2. - Cumplir con las disposiciones Administrativas, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes.
3. - En la realización del proyecto propuesto, se responsabilizará al titular de la investigación de cualquier impacto significativo que resulte sobre las poblaciones de la flora o fauna silvestres y sus hábitats, por lo que deberá considerar el riesgo de perturbación del ecosistema, antes de su ejecución y no llevarlo a cabo si existe algún riesgo.
4. - Previo al inicio de las actividades de campo, deberá enviar obligatoriamente por escrito y utilizando cualquier medio su programa de trabajo a la Delegación Federal de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales en el **Estado de México** (Tel. 01 (722) 276 78 06, 276 7835), enviando copia del mismo a la Dirección General de Vida

1 de 2



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**

DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE
AV. REVOLUCIÓN No. 1425,
COL. TLACOPAC,
DELEG. ÁLVARO OBREGÓN
01040-MÉXICO, D. F.

OFICIO NÚM. SGPADGVS/ 07165

MÉXICO, D. F., A 08 JUL, 2005

Silvestre. De igual manera, al término de dichas actividades lo notificará a esa Delegación Federal, enviando un reporte detallado por escrito.

5. - **La totalidad del material colectado deberá destinarse exclusivamente a los fines específicos del proyecto, objeto de la presente autorización.** Con base al Capítulo IV, artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, el material colectado será analizados en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, donde el titular, asume la responsabilidad de remitir a esta Dirección General, copia de la(s) constancia(s) del(os) depósito(s) debidamente firmado(s), especificando la cantidad de ejemplares depositados.

6. - Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, el responsable deberá someter a la consideración de la Dirección General de Vida Silvestre, en un plazo no mayor de 30 (TREINTA) días de concluida la vigencia de la presente, un informe que describa **detalladamente** las actividades realizadas, especificando el número de ejemplares capturados y liberados por especie, los resultados obtenidos, la problemática del área trabajada, las potenciales alternativas de solución y en su oportunidad, la(s) publicación (es) y sobretiros producto de la investigación.

7. - Queda estrictamente **prohibido** efectuar cualquier aprovechamiento de las especies de flora y fauna silvestres, cualesquiera que sea su estatus, excepto lo aquí autorizado, así como realizar actividades en áreas naturales protegidas de México, sean Estatales o Federales, sin previa autorización.

8. - **De acuerdo al Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y al Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, esta autorización no ampara el aprovechamiento de los especímenes colectados para fines comerciales, ni de utilización en biotecnología.**

Se recomienda que durante sus actividades de campo, en el caso de encontrar ejemplares de especies listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, se notifique de ello (la especie, ubicación geográfica y la fecha) a esta Dirección General, en el informe de actividades referido en la cláusula número seis antes mencionado.

La presente autorización es personal e intransferible y habrá de mostrarse a las Autoridades Federales, Estatales y Municipales cuantas veces lo soliciten. Asimismo, tomando en consideración lo establecido por el Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y por el Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, el titular de la presente deberá contar con la autorización expresa de los legítimos propietarios de la(s) tierra(s) donde pretende desarrollar el proyecto.

El incumplimiento de las condiciones aquí establecidas, dará origen a la instauración de un procedimiento administrativo ante la autoridad competente, para proceder a la cancelación de la autorización y a la aplicación de la legislación correspondiente, según sea el caso.

ATENTAMENTE
SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.
EL DIRECTOR GENERAL

FELIPE RAMÍREZ RUIZ DE VELASCO



Copias al reverso.../



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**

DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

AV. REVOLUCIÓN No. 1425,
COL. TLACOPAC,
DELEG. ÁLVARO OBREGÓN
01040-MÉXICO, D. F.

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/

09813

MÉXICO, D. F., A

09 SET. 2005

Septiembre de 2005,
veinte años de participación solidaria desde los sismos del '85

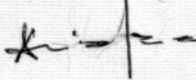

MVZ. EDGAR ARTURO CUEVAS DOMÍNGUEZ
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CIRCUITO EXTERIOR S/N, C. U.,
04510-COYOACÁN, MÉXICO, D. F.
TEL. 2158 5852
cuevasedgar@yahoo.com.mx

En alcance al Oficio NÚM.SGPA/DGVS/07165 de fecha 06 de julio del año 2005, medio por el cual se autorizó el desarrollo del proyecto denominado "Determinación de virus en aves migratorias ubicadas en los humedales del Estado de México, a través de hisopos de cloaca y faringe"; al respecto, tengo a bien informarle que **no existe inconveniente** en que se incluyan las Ciénegas de Lerma del Estado de México en el proyecto.

Sin embargo, deberá cumplir con las disposiciones Administrativas, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes. Obligatoria y previo al inicio de las actividades de campo deberá contactar al C. Guillermo Ramírez Fillipini, Director Regional de a Región Centro y Golfo (Nueva Tabachin No. 104, Col. Tlaltenango, Mpio. de Cuernavaca, Morelos, C.P. 62170, Tel/Fax (777) 37 22 219, e-mail: gfillipini@conanp.gob.mx), para presentar copia del proyecto de investigación, programa de actividades, lista de participantes y fechas en que pretenden ingresar al Área Natural Protegida; así mismo se le asignará el personal del ANP que lo acompañarán durante los trabajos de campo y deberá acatar las indicaciones y recomendaciones que le haga dicho personal.

Finalmente, le informo que este oficio deberá estar acompañado invariablemente del similar arriba citado y queda sujeto estrictamente a las condiciones establecidas en el mismo.

ATENTAMENTE
SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.
EN AUSENCIA DEL DIRECTOR GENERAL,
CON FORME AL ARTÍCULO 154 DEL REGLAMENTO
INTERIOR DE LA SEMARNAT, FIRMA EL PRESENTE
DIRECTOR DE CONSERVACIÓN DE LA VIDA SILVESTRE


ARIEL ROJO CURIEL


- C.c.p.
- C. Francisco Giner De Los Ríos.- Subsecretario de Gestión para la Protección Ambiental.- Edificio.
 - C. José Bernal Stoopan.- Director General de Inspección de Vida Silvestre, PROFEPA.- Carr. Picacho Ajusco No. 200, Col. Jardines de la Montaña, Deleg. Tlalpan, C. P. 14210, México D. F.
 - C. Ricardo Tejeda Nichols.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de México.- Rancho San Lorenzo, Conjunto SEDAGRO, Edificio C-1, C.P. 52140, Metepec, Estado de México.
 - C. Guillermo Ramírez Fillipini.- Director Regional de a Región Centro y Golfo (Nueva Tabachin No. 104, Col. Tlaltenango, Mpio. de Cuernavaca, Morelos, C.P. 62170).
 - C. David Gutiérrez Carbonell.- Director General de Manejo para la Conservación de Áreas Naturales Protegidas, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.- Carr. Picacho Ajusco No. 200, 6º. Piso, Col. Jardines de la Montaña, Delegación Tlalpan, C. P. 14210, México, D. F.
 - C. Fernando Sánchez Camacho.- Jefe del Departamento de Análisis para el Aprovechamiento de Otras Especies. Edificio.

Minutario
DRF/MACG/FSC/ESR

c:\colecta\cientifica\cances\oficio\canceEdgar-Cuevas_aves.doc esr (06/09/05)

11.3 Anexo 3.

TOMA DE MUESTRAS



Fig. 3.1. Toma de muestra cloacal mediante hisopos de algodón estéril.



Fig. 3.2. Toma de muestra traqueal mediante hisopos de algodón estéril.



Fig. 3.3. Especies de anátidos (cerceta ala azul, *Anas discors*) producto de la actividad cinegética.

11.4 Anexo 4

Inoculación de embriones

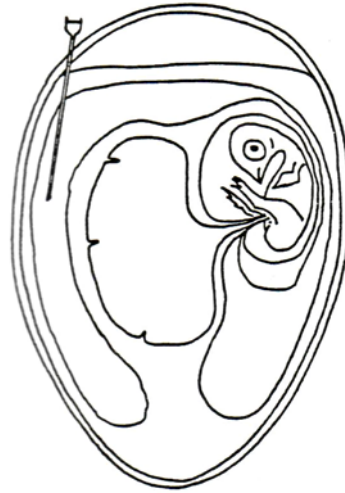


Fig. 4.1. Inoculación ruta alantoidea.⁶⁷

1. Ovoscopiar para checar viabilidad embrionaria.
2. Marcar el sitio de inoculación.
3. Desinfectar lugar de inoculación con solución de yodo al 2.5%.
4. Se realiza la perforación mediante herramientas previamente desinfectadas del sitio marcado para inocular.
5. Usando una jeringa de insulina estéril (aguja 27GX13mm) se procede a inocular la muestra (0.2ml de inoculo obtenido por embrión) vía cavidad alantoidea de 5 a 10 embriones. Otros cinco embriones se dejan como control.
6. Se sella con pegamento blanco el orificio de inoculación.
7. Los embriones son incubados a 37°C por 7 días y revisados 2 veces al día mediante el ovoscopio para descartar muerte embrionaria.
8. Los embriones que mueran en las primeras 24 horas son descartados, ya que se considera muerte por traumatismo o por contaminación.
9. Los embriones muertos después de las 24 horas post inoculación se les deberá cosechar el líquido alantoideo. Para la prueba de hemoaglutinación en placa.
10. A las 48 horas post inoculación, recolectar líquido alantoideo del 50% de los embriones inoculados por muestra. Para la prueba de hemoaglutinación en placa.

Anexo 4.1

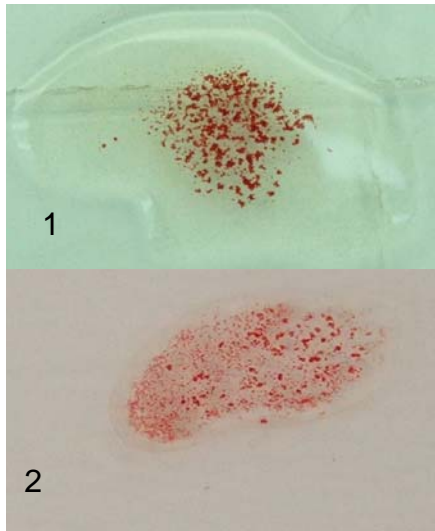
Prueba de hemoaglutinación en placa

Este método es una prueba estándar para probar los líquidos embrionarios sospechosos para detectar la posible presencia de actividad hemoaglutinante con la utilización de eritrocitos de pollo (*Gallus gallus*).

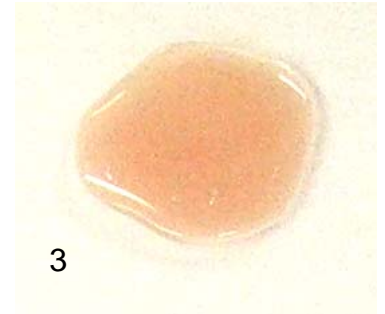
- 1.- Colocar en una placa de acrílico 25ul de líquido alantoideo sospechoso y una 50ul de glóbulos rojos de pollo (*Gallus gallus*) al 2%.
- 2.- Mover la placa de acrílico suavemente para que se mezclen homogéneamente los glóbulos rojos con el líquido alantoideo sospechoso.
- 3.- Esperar de 5 a 10 minutos
- 4.- Si la prueba resulta positiva a hemoaglutinación nos indica presencia de virus capaz de hemoaglutinar glóbulos rojos, por lo cual estas muestras son sometidas nuevamente a inoculación en embriones, para corroborar su replicación. Además toda prueba positiva es sometida a una prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

Si ocurre hemoaglutinación positiva(Fig.1 y 2), la misma deberá ser inhibida con un suero hiperinmune específico contra el virus de Newcastle, igualmente se deberá hacer control de esterilidad para comprobar que el líquido alantoideo está libre de bacterias. Los líquidos alantoideos que resultan negativos (Fig.3) a la prueba de hemaglutinación en placa, se inocularán nuevamente en un pase ciego en huevos embrionados pollo para corroborar que no hay virus, además con un segundo pase pudiera activarse algún virus capaz de hemoaglutinar.

Prueba de hemaglutinación en placa, se observa la actividad hemaglutinante



Líquidos positivos a hemaglutinación



Líquido alantoideo
negativo a hemaglutinación

A toda prueba positiva a hemoaglutinación se puede someterla nuevamente a inoculación en embriones, para corroborar obtener mayor cantidad de líquido alantoideo para posteriores pruebas de laboratorio

5. El líquido alantoideo positivo a hemaglutinación es centrifugado a 1500 X g. por 15 minutos y filtrado respectivamente, y será conservado en congelación a -70°C hasta su uso.

Además toda prueba positiva es sometida a una prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Es importante determinar si la actividad hemaglutinante detectada en el líquido alantoideo se debe a un orthomyxovirus o paramyxovirus.

Anexo 4.2

Prueba de inhibición de la hemoaglutinación en placa:

A toda prueba positiva a hemoaglutinación se le realiza una prueba de inhibición de la hemoaglutinación para enfermedad viral de Newcastle. Esta prueba consiste en someter 2 cantidades de 0.5ml de líquido alantoideo que haya resultado positivo a hemoaglutinación en placa.

1.- A una de las cantidades se le agrega 0.2µl de glóbulos rojos al 2% de pollo (*Gallus gallus*),

2.- A la otra se le agrega .1ml de antisuero hiperinmune de la enfermedad viral de Newcastle y se esperan 5 minutos antes de añadirle 0.2µl de glóbulos rojos al 2% de pollo (*Gallus gallus*).

Ambas muestras se homogenizan y se observa si el antisuero fue capaz de inhibir la hemoaglutinación. Si logra el antisuero inhibir esta característica, quiere decir que el virus presente capaz de hemoaglutinar corresponde al tipo de antisuero empleado.

11.5. ANEXO 5.

Tabla. Componentes del medio de transporte viral Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (1X) líquido (alto en glucosa) usado para la conservación durante la transportación de las muestras de hisopos cloacales y tráqueales.

Componentes	Peso Molecular	Concentración (mg/L)	Molaridad (mM)
Amino ácidos			
Glicina	75	30	0.400
L-Hidrocloruro de Arginina	211	84	0.398
L-Cistina 2HCl	313	63	0.201
L-Glutamina	146	584	4.00
L-Hidrocloruro de Histidina-H ₂ O	210	42	0.200
L-Isoleucina	131	105	0.802
L-Leucina	131	105	0.802
L-Hidrocloruro de lisina	183	146	0.798
L-Metionina	149	30	0.201
L-Fenilalanina	165	66	0.400
L-Serina	105	42	0.400
L-Teonina	119	95	0.798
L-Triptofano	204	16	0.0784
L-Tiroxina sal	261	104	0.398
L-Valina	117	94	0.803
Vitaminas			
Cloruro de colina	140	4	0.0286
Pantotenato de calcio	477	4	0.00839
Acido fólico	441	4	0.00907
i-Inositol	180	7.2	0.0400
Niacinamida	122	4	0.0328
Hidrocloruro de piridoxina	204	4	0.0196
Riboflavina	376	0.4	0.00106
Hidrocloruro de tiamina	337	4	0.0119

Sales Inorganicas			
Cloruro de Calcio (CaCl ₂) (anhyd.)	111	200	1.80
Nitrato ferrico(Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404	0.1	0.000248
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄) (anhyd.)	120	97.67	0.814
Cloruro de Potasio (KCl)	75	400	5.33
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	84	3700	44.05
Cloruro de Sodio (NaCl)	58	6400	110.34
Fosfato de Sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138	125	0.906
Other Components			
D-Glucosa (Dextrosa)	180	4500	25.00
Rojo Fenol	376.4	15	0.0399

***Nota:** HCl piridoxina replenplaza HCl piridoxal.

Referencia: Dulbecco, R. and Freeman, G. (1959) Virology 8:396.

11.6 Anexo 6.



SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN

"2006, año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas, Don Benito Juárez García"

Dirección General de Salud Animal

Comisión México Estados Unidos para la
Prevención de la Fiebre Aftosa y otras
Enfermedades Exóticas de los Animales

Oficio No. B00.02.06.01. 002070

México D.F., 4 de septiembre de 2006.

A quién corresponda

Con respecto a la solicitud: 0821000006606 ingresada al Sistema de Solicitudes de Información del IFAI, del día 14 de agosto, la cual a la letra dice: *Quisiera que me confirmaran de que el aislamiento de Lerma, Estado de México en un Anas cyanoptera se trata de H7N2 (hemoaglutinina H7 y neuraminidasa N2). Este reporte esta en su reporte semana. SEMANA 24 del 11 al 17 de junio de 2006 y continua en su acumulativo de la semana 31:*

Le informo, que como se refiere en la solicitud en comento, los estudios realizados al momento de la publicación del Informe Semanal sobre Enfermedades de Reporte Obligatorio-SEMANA 22; indicaban que se trataba de un virus subtipo H7N2.

Sin embargo, con el propósito de tener información mas precisa de la estructura genómica del virus se procedió a realizar el análisis de la muestra con unos primers para neuraminidasa que amplificaban un segmento de mayor número de pares de bases, posteriormente se llevó a cabo la secuenciación de ese segmento en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, de la Secretaría de Salud y al comparar los resultados obtenidos con los datos del Banco de Genes, se encontró que esta secuencia tenía identidad con un virus subtipo H7N3.

Por lo que en el Reporte Obligatorio correspondiente a la SEMANA 33, se realizó la aclaración correspondiente.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE.
SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.
EL DIRECTOR DE LA CPA**

MVZ IGOR ROMERO SOSA

DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD
ANIMAL



COMISIÓN MÉXICO-ESTADOS UNIDOS
PARA LA PREVENCIÓN DE LA FIEBRE
AFTOSA Y OTRAS ENFERMEDADES
EXÓTICAS DE LOS ANIMALES

C.c.p. MVZ. Enrique Sánchez Cruz. Director de la Dirección General de Salud Animal.
MVZ. Arturo Campomanes Cortés. Subdirector Técnico de la CPA.

IRS/mak

12. Literatura Citada.

1. Brooks, R.D., Ferrano, A.L. The historical biogeography of co-evolution: emerging infectious diseases are evolutionary accidents waiting to happen. *J. Biogeogr.* 2005;32:1291-1299.
2. Ceballos G., Valdemar M. Las aves de México en peligro de extinción. Fondo de Cultura Económica. CONABIO. INE. 2000.
3. S.E.M.A.R.N.A.T. (Secretaría de Marina y Recursos Naturales) Conservación Aves Migratorias Neotropicales en México. Reporte Técnico. 1994.
4. Arellano, M. Aves acuáticas migratorias en México. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Rentables. 1956. México. D.F.
5. S.E.M.A.R.N.A.T. (Secretaría de Marina y Recursos Naturales) Plan de Manejo de Aves Acuáticas de Norteamérica. Guía Estratégica. 2004.
6. Bengis, R.G., Leighton, F.A., Fischer, J.R., Artois, M., Mörner, T. and Tate, C.M. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2004; 23(2):497-511.
7. Reed, D.K., Meece, K.J., Henkel, S.J., Shukla, K.S. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clinical Medicine and Research.* 2003; 1(1): 5-12.
8. Slingenbergh, J., Gilbert, M. De Balogh, K. and Wint, W. Ecological sources of zoonotic diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2003; 23(2): 467-484.
9. Nichol, S.T., Arikawa, J. and Kawaoka, Y. Emerging viral diseases. *PNAS.* 2000; 97(23): 12411-12412.

10. Hubálek,Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*. 2004; 40(4): 639-659.
11. Ellis, M.T., Bousfield, B.R., Bissett, L.A., Dyrting, C.K., Luk, S.M., Tsim, T.S., Ramírez, S.T., Webster, R.G., Yi Guan and Malik Peiris, J.S. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathology*. 2004; 33(5): 492-505.
12. Sharp, B.G., Kawaoka, Y., Jones, D.J., Bean, W.J, Pryor, S.P., Hinshaw, V. and Webster, R.G. Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: Distribution patterns and biological significance. *Journal of Virology*. 1997.71: 6128-6135.
13. Ito, T., Okazaki, K., Kawaoka, Y., Takada, A. Webster, R.G. and Kida, H. Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch. Virol*. 1995; 140: 1163-1172.
14. Deibel,R.,Emord,D.,Dufelow,W.,Hinshaw,V.,Wood,J. Influenza viruses and paramyxoviruses in ducks in the Atlantic flyway, 1977-1983, including and H5N2 isolate related to the virulent chicken virus. *Avian Diseases*. 1985; 29: 970-985.
15. Hinshaw, V.,Webster, R., Turner, B. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can. J.Micro*.1980; 26: 622-629.
16. Stanislawek, W., Wilks, C., Meers, J., Horner, G., Alexander, D.J., Manvell, R.J., Kattenbelt, J.A. and Gould, A.R. Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. *Arch. Virol*. 2002; 147: 1287-1302.

17. F.A.O. (Food and Agriculture Organization of The United Nations). Wild birds and avian influenza. Special Report. Animal Health. 2004.
18. Webster, R.G., Influenza: An emerging disease. Emerging Infectious Diseases. 1998; 4(3): 436-441.
19. Okazaki, K., Takada, A., Imai, M., Takakuwa, H., Hatta, M., Ozaki, H., Tanazaki, T., Nagana, T., Ninomiya, A. and Demenev, V.A. Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. Arch. Virol. 2000: 885-893.
20. Khawaja, J.Z., Naeem, K., Ahmed, Z. and Ahmad, S. Surveillance of avian influenza viruses in wild birds in areas adjacent to epicenter of an outbreak in federal capital territory of Pakistan. International Journal of Poultry Science. 2005; 4(1): 39-43.
21. Cann, A.2007. Myxoviruses.
<http://www.microbiologybytes.com/virology/Orthomyxoviruses.html>
22. García, J. Influenza Aviar: Control Epidemiológico
<http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/animal/aviar/pdf/ControlIAAP.pdf>
23. Slemons R.D., Johnson D.C., Osborn J.S. and Hayes F. Type-A influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. Avian Dis. 1974;18:119-124.
24. Webster, R.G, Bean, W., Gorman, O., Chambers, T., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev.1992;56(1):152-179.
25. Ito T and Kawaoka Y. Host range barrier of Influenza A viruses. Vet Microb. 2000; (74): 71-75.

26. Reid, A. H., Fanning, T. G., Hultin, J. V. & Taubenberger, J. K. Origin and evolution of the 1918 'Spanish' influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci.*1999: 1651–1656.
27. Süß, J., Schäfer, J., Sinnecker, H. and Webster, R.G. Influenza virus subtypes in aquatic birds of Eastern Germany. *Arch. Virol.* 1994; 135: 101-114.
28. Munster, V., Wallensten, A., Baas, C., Rimmelzwaan, G.F., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A.D.M.E and Fouchier, R.A.M. Mallards and highly pathogenic avian influenza ancestral viruses, Northern Europe. *Emerging Infectious Diseases.* 2005; 11(10): 1545-1551.
29. De Marco, M.A., Foni, G.E., Campitelli, L., Raffini, E., Di Trani, L., Delogu, M., Guberti, V., Barigazzi, G. and Donatelli, I. Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-99 period: Evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. *Avian Diseases.*2003; 47: 861-866.
30. Perdue, M.L., García, M., Senne, D., Farire, M. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res.* 1997; 49: 173-186.
31. Potter, C.W. A history of influenza. *The Society for Applied Microbiology.* 2001; 91: 572-579.
32. Swayne, D.E. and Suárez, D.L. Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2000; 19: 463-482.
33. Claas, E.C., Osterhaus, A.D., Van Bek, R. De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Senne, D.A., Krauss, S., Shortridge, K.F., Webster, R.G. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet.* 1998; 351: 472-477.

34. Weaver, T. Avian influenza surveys in waterfowl, Part I : The role of wild and domestic waterfowl in avian influenza outbreaks in domestic poultry. NAHSS Outlook. 2005.February. www.aphis.usda.gov.
35. Fouchier, R.A.M., Olsen, B., Bestebroer, T.M.M Herfst, S., Van der Kemp, L.,Rimmelzwaan, G.F.and Osterhaus, A.D.M.E. Influenza A virus surveillance in wild birds in Northern Europe in 1999 and 2000. Avian Diseases. 2003; 47: 857-860.
36. Hanson, B.A., Stallknecht, D.E., Sawyne, D.E., Lewis, L.A. and Senne, D.A. Avian influenza viruses in Minnesota ducks during 1998-2000. Avian Diseases. 2003; 47: 867-871.
37. Stallknecht, D.E., Shane, S.M., Zwank, P.J., Senne,D.A. and Kearney, M.T. Avian influenza viruses from migratory and resident ducks of Coastal Louisiana. Avian Diseases. 1990; 34: 398-405.
38. Stallknecht, D, Kearney, Shane S, Zwank P. Effects of pH, temperatura and salinity on persistente of avian influenza virus in water. Avian Diseases 1990 ^a ; 34 (2): 412-8.
39. Stallknecht, D., Kearney, Shane S, Zwank P. Persistence of avian influenza viruses in water . Avian Diseases 1990b ; 34 (2): 406-11.
40. Alexander, D.J.Newcastle disease. Disease of poultry, 11th ed. Saif, Y.M. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 2003: 63-99.
41. Morrison, T. G. 2003. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. Biochim. Biophys. Acta 1614:73-84.

42. Takimoto, T., Portner, A. Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Research*. 2004; 106 (2):133-145.
43. Ito, T., Kawaoka, Y., Kameda, C., Yasuda, J., Kida, H., Otsuki, K.. Differences in receptor specificity between Newcastle Disease viruses originating from chickens and waterfowl. *J. Vet. Med. Sci.* 1999;61 (8): 951-953.
- 44.. Alexander, D.J. The classification, host range and distribution of avian paramyxoviruses. Acute virus infection of poultry, J.B.McFerran and M.S. McNulty (eds). Martinus Nijhoff, Dordrecht, Netherlands. 1985: 52-66.
- 45 Alexander, D.J. Newcastle disease. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 3th. American Association of Avian Pathologists. 2003:114-120.
- 46 Shihmanter, E., Weisman, Y., Manwel, R., Alexander, D., Lipkind, M. Mixed paramixovirus infection of wild and domestic birds in Israel. *Veterinary Microbiology*. 1997; 58: 73-78.
- 47 Nerome, K., Shibata, M., Kobayashi, S., Yamaguchi, R., Yoshioka, Y., Ishida, M. and Oya, A. Immunological and genomic analyses of two serotypes of avian paramixovirus isolated from wild ducks in Japan. *Journal of Virology*. 1984; 50(2): 649-653.
48. Kaleta, E.F., Baldauf, C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In : Alexander, D.J. (Ed.), *Newcastle Disease*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1988:197-246.
49. Takakuwa, H., Ito, T., Takada, A., Okazaki, K., Kida, H. Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 1998; .45(4): 207-215.
<http://hdl.handle.net/2115/2613>

50. Smitka, C.W., Maassab, H.F. Ortho and Paramyxoviruses in the migratory waterfowl of Michigan. *Journal of Wildlife Diseases*. 1981; 17(1): 147-151.
- 51 Maldonado, A. Arenas, A., Tarradas, M.C., Luque, I., Astorga, R., Perea, J.A. and Miranda, A. Serological survey for avian paramyxoviruses from wildfowl in aquatic habitats in Andalusia. *Journal of Wildlife Diseases*. 1995; 31(11): 66-69.
52. Zannetti F, Berinstein A, Pereda A, Taboga O, and Carillo E..Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. *Avian diseases*. 2005 ; 49:546-550.
53. Stallknecht D, Senne D, Zwank P, Shane S, and Kearney M. Avian paramyxoviruses from migrating and resident ducks in Coastal Louisiana. *Journal of Wildlife Diseases*, 1991; .27 (1):123-128.
54. Stanislewski, W.L., C.R. Wilks, J. Meers, G.W. Horner, D.J. Alexander, R.J. Manvell, J.A. Kattenbelt, and A.R. Gould. Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks in New Zealand. *Arch. Virol*. 2002; 147: 1287-1302.
55. Jorgensen, P.H., K.J. Handberg, P. Ahrens, O.R. Therkildsen, R.J. Manvell, and D.J. Alexander,,: Strains of avian paramyxovirus type 1 of low pathogenicity for chickens isolated from poultry and wild birds in Denmark. *Vet. Rec*. 2004; 154:.. 497-500.
56. Mohan, C.M., S. Dey, and K. Kumanan. Molecular changes of the fusion protein gene of chicken embryo fibroblast-adapted velogenic Newcastle Disease virus: effect on its pathogenicity. *Avian Dis*. 2005:49: 56-62.

57. Toyoda, T., Sakaguchi T., Hirota, H. Gotoh, B., Kuma, K., Miyata T. and Nagai Y. Newcastle disease virus evolution II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology* 1989;169: 273–282.
58. Yu, L., Wang, Z., Jiang, Y., Chang, L., Kwang, J. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the people's Republic of China and Taiwan . *J.Clin. Microbiol.* 2001;39: 3512-3519.
59. Liu, H., Wang, Z., Wu, Y., Zheng, D., Sun, C., Bi, D., Zuo. Y., Xu, T. Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated in China in 2005. *Journal of Virological Methods* . 2007;140.:206-211.
60. Gould, R., Kattenbelt, A., Selleck , P., Hansson, E., Della-Porta, A., Westbury, A. Virulent Newcastle disease in Australia: Molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Research.* 2001;77 (1): 51-60.
61. Alexander, D., Campbell, G., Manvell, R., Collins, M., Parsons, G. and McNulty, M. Characterisation of an antigenically unusual virus responsible for two outbreaks of Newcastle disease in the Republic of Ireland in 1990. *Veterinary Record* 1992;130: 65-68.
62. Collins, M. S., Bashiruddin, J., and Alexander, D. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch Virol.* 1993;128:363-370.
63. Shengqing, Y., Shinya, K., Otsuki, K., Ito, H., Ito, T. Isolation of myxoviruses from migratory waterfowls in San-in District, Western Japan in winters of 1997-2000. *J.Vet. Med. Sci.* 2002;64 (11):1049-1052.

64. Shengqing, Yu, Khishida N, Ito H, Kida H, Otsuki K, Kawaoka Y, and Ito T. Generation of Velogenic Newcastle Disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. *Virology*. 2002;301(2):206-211.
- 65.. Johnson, F.B. Transport of viral specimens. *Clinical Microbiology Reviews*. 1990; 3(2): 120-131.
66. Beard, W.C. Influenza. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 3th. American Association of Avian Pathologists. 2003:110-113.
67. Senne, A.D. Virus propagation in embrionating eggs. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 3th . American Association of Avian Pathologists. 2003: 176-181.
68. F.A.O. (Food and Agriculture Organization of The United Nations). Guiding principles for highly pathogenic avian influenza surveillance and diagnostic networks in Asia. FAO. Expert meeting on surveillance and diagnosis of avian influenza in Asia. Bangkok. 2004:1-32.
69. O.I.E. (World Organization for Animal Health). Avian Influenza. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. 2005.
70. W.H.O. (World Health Organization) WHO Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Department of communicable disease surveillance and response. W.H.O. Global Influenza Programme. 2005.
71. Spackman, E., McCracken, K., Winker, K., Swayne, D. H7N3 avian influenza virus found in a South American wild duck is related to Chilean 2002 poultry outbreak, contains genes from equine and north American wild bird lineages, and is adapted to domestic turkeys.. *Journal of Virology*. 2006;80: 7760-7764.

72. Alexander, D.J.A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 2000;22: 2–13.
73. The National Emergency Epidemiology Group. Low pathogenic Avian influenza H7N3 outbreak in Norkolk, England. Final Epidemiology .2006.Report. <http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/notifiable/disease/ai/latest-situation/dereham.htm>
74. Senne, D. Avian Influenza in North and South America, 2002–2005 *Avian Diseases* 2007;51:167:173.
75. Tweed S, Skowronski D, David D, Larder A, Petric M, Lees W, Yan li, Katz J, Kraiden M, Tellier R, Halpert C, Hirst M, Astell C, Lawrence D, Mak A. Human illness from avian influenza H7N3 British Columbia. *Emerging infectious diseases.* 2004; 10 (12). <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no12/04-0961.htm>
76. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Vennema H. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet.* 2004; 363: 587-593.
77. Campitelli, L., Mogavero E., Maria , D., Delogu, M., Puzelli, S., Frezza, F., Facchini, M., Chiapponi, C., Foni, E., Cordioli, P., Webby, R., Barigazzi, G., Webster, R., Donatelli, I. Interspecies transmission of an H7N3 influenza virus from wild birds to intensively reared domestic poultry in Italy.. *Virology.* 2004; 323 (1): 24-36.
78. Guan, Y., Poon L., Cheung C., Ellis, T., Lim, W., Lipatov, A., Chan, K., Sturm-Ramirez, K., Cheung, C., Leung Y., Yuen ,K., Webster R. G., and J. S. M. Peiris. H5N1 influenza: A protean pandemic threat. *PNAS.*2004; 101 (21): 8156-8161. <http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/21/8156>

79. Fouchier R, Schneeberger,P., Rozendaal, F., Broekman, J., Kemink,S., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G., Schutten, M., Van Doornum, G., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M. and Osterhaus, A. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. PNAS. 2004; 101 (5): 1356-1361.
<http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/5/1356>
80. Wallensten A, Munster VJ, Latorre-Margalef N, Brytting M, Elmberg J, Fouchier RA, Fransson T, Haemig PD, Karlsson M, Lundkvist A, Osterhaus AD, Stervander M, Waldenström J, Björn O. Surveillance of influenza A virus in migratory waterfowl in northern Europe. Emerg Infect Dis. 2007;13(3):404-411.
81. Spackman, E., McCracken, K., Winker, K., Swayne, D. An avian influenza virus from waterfowl in Sout America contains genes from North American avian and equine lineages. Avian Diseases. 2007;51:273-274.
82. Alexander, D.J. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa and Australasia, 2002-2006. Avian Diseases. 2007;51: 161-166.
83. Fereidouni, S., Aghakhan,M., Werner, O., Starick, E., Bozorghmehrifard, M. Isolation and identification of avian influenza viruses from migratory birds in Iran. Veterinary Record. 2005;157(17):526.
84. Pantin-Jacwood, M and Swayne, D. Pathobiology of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ducks.Avian Diseases 2007;51:250-259.
85. Webster, R., Hulse-Post, D., Sturm-Ramirez, M., Guan, Y., Peiris, M., Smith, G., and Chen, H. Changing epidemiology and ecology of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses. Avian Diseases 2007;51:269-272.

86. Sturm-Ramírez, K., Ellis, T., Bousfield, B., Bissett, L., Dyrting, K., Rehg, J., Poon, L., Guan, Y., Peiris, M., and Webster R. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J. Virol.* 2004;78: 4892-4901.
87. Gilbert, M., Chaitaweesub, P., Parakamawongsa, T., Premashthira, S., Tiensin, T., Kalpravidh, W., Wagner, H. and Slingenbergh, J. Free-grazing ducks and highly pathogenic avian influenza, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 2006;12:227-234.
88. Sturm-Ramírez, K., Hulse-Post, D., Govorkova, E., Humberd, J., Seiler, P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, D., Chaisingh, A., Long, H., Naipospos, T., Chen, H., Ellis, T., Guan, Y., Peiris, J. and Webster, R. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia?. *J. Virol.* 2005;79:11269-11279.
89. Brown, J., Swayne, D., Cooper, R., Burns, R., and Stallknecht, D. Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. *Avian Diseases* 2007;51:285-289.
90. Ottis, K and Bachman P. Isolation and characterization of ortho- and paramyxoviruses from feral birds in Europe. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B* 1983;30:22-35.
91. Nettles, V, Wood M, Webster R. Wildlife surveillance associate with and outbreak of lethal H5N2 avian influenza in domestic poultry . *Avian diseases* 1985; 29:733-741.

92. Hinshaw V, Wood M, Webster R, Deibel R, and Turner B. Circulation of influenza viruses and paramyxoviruses in waterfowl originating from two different areas in North America. *World Health Organization Bulletin* 1985; 63:711-719.
93. Bozorgmehri- Fard, M and Keyvanfar H. Isolation of Newcastle disease virus from teals (*anas crecca*) in Iran. *Journal of wildlife Diseases* 1979;15: 335-337.
94. Zou, J., Shan, S., Yo, N., Gong, Z. Complete genome sequence and biological characterizations of a novel goose paramyxovirus-SF02 isolated in China. *Virus Genes* . 2005; 30(1):13-21.
95. Lipkind, M, Shihmanter Y, Weisman A, Aronovici and Shoham D. Characterization of Yucaipa-like avian paramyxoviruses isolated in Israel from domestic and wild birds . *Annals of Virology*. 1982;74: 211-217.
96. Alexander , D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et technique, Office Internationale des Epizooties*. 2000;19 (2) :443-462.
97. Leslie, J. Newcastle disease: outbreak losses and control policy costs. *Veterinary Record*. 2000 ;146:603-606.
98. Vickers, M, and Hanson R. Newcastle disease virus in waterfowl in Wisconsin. *Journal of Wildlife Diseases*. 1982; 18 (2):149-158.
99. Werner, O. Römer-Oberdörfer A, Köllner B, Manvell R, Alexander D. Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996. *Avian pathology*. 1999;28:79-88.

100. Pedersen J, Senne D, Woolcock P, Hailu K, Daniel J, Wise M, Panigraphy B, Seal B. Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and recent outbreaks in north America. *Journal of clinical microbiology* . 2004;42 (5):2323-2334.
101. Abenes G, Okazaki K, Fukushi H, Kida H, Honda E, Yagyu K, Tsuji M, Sato H, Ono E, Yanagawa R, and Yamauchi, N. Isolation of ortho- and paramyxoviruses from feral birds in Hokkaido, Japan- 1980 and 1981. *Japanese Journal of Veterinary Science*. 1982;44 : 703-708.
102. Mikami T, Kawamura M, Kondo T, Murai T, Horiuchi M, Kodama H, Izawa H, and Kida H. Isolation of ortho- and paramyxoviruses from migrating feral ducks in Japan. *Veterinary Record*. 1987;120: 417-418.
103. Deibel R, Emord D, Dukelow W, Hinshaw V, and Wood J. Influenza viruses and paramyxoviruses in ducks in the Atlantic flyway, 1977-1983 including and H5N2 isolate related to the virulent chicken virus. *Avian Diseases*.1985; 29:970-985.
104. Spalatin, J. and Hanson, R.P. Epizootiology of Newcastle disease in water fowl. *Avian Dis*. 1975;19(3): 573- 582.
105. Friend, M., and Trainer, D.O. Experimental Newcastle disease studies in the mallard: *Avian Diseases*. 1972;16(4):700-713.
106. Vickers, M., Hanson, P. Characterization of Isolates of Newcastle Disease Virus from Migratory Birds and Turkeys *Avian Diseases*. 1982;26 (1):127-133.

107. Hlinak, A., Mühle, R., Werner, O., Globig, A., Starick, E., Schirrmeyer, H., Hoffmann, B., Engelhardt, A., Hübner, D., Conraths F., Wallschläger, D., Kruckenberg, H., Müller, T. A virological survey in migrating waders and other waterfowl in one of the most important resting sites of Germany. *J. Vet. Med.* 2006; 53: 105-110.
108. Swayne, D.E., and R.D. Slemons, Comparative pathology of intravenously inoculated wild duck- and turkey-origin type A influenza viruses in chickens. *Avian Dis.* 1995;39:74-84.
109. Hlinak, A., Müller, M., Kramer, R., Mühle, H., Liebherr and Ziedler, H.. Serological survey of viral pathogens in bean and white-fronted geese from Germany. *J. Wildl. Dis.* 1998;34: 479-486.
110. Müller, T., Hlinak, A., Mühle, R., Kramer, M., Liebherr, H., Ziedler, K., Pfeiffer, D. A descriptive analysis of the potential association between migration patterns of bean and white fronted geese and the occurrence of Newcastle disease outbreaks in domestic birds. *Avian Dis.* 1999;.43:315-319.
111. Foni, E., Chiapponi, C., Lori, D., De Marco, M.A., Delogu, M., Raffini, E., Massi, P. Detection of influenza A virus by RT-PCR and Standard methods in experimental infection of ducks. *The New Microbiologica.* 2005; 28: 21-25.
112. Takakuwa, H. Study on ecology and pathogenicity of Newcastle disease viruses. *Journal of Veterinary Research.* 1998; 46(2-3): 106-107.
<http://hdl.handle.net/2115/2659>
113. Olsen, B. Munster, V., Wallensten, A., Waldenstrom, J., Osterhaus, A. and Fouchier, R. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science.* 2006 ; 312: 384-38.

114. Webster, R.G., Hulse, D.J. Microbial adaptation and change: avian influenza. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2004; 23(2): 453-465.

115. Hanson, B., Swayne, D., Senne, D., Lobpries, D., Hurst, J., Stallknecht, D.. Avian influenza viruses and paramyxoviruses in wintering and resident ducks in Texas. *Journal of Wildlife Diseases*, 2005; 41 (3): 624-628.

116. Weber, T and Stilianakis, N. Ecologic immunology of avian influenza (H5N1) in migratory birds. 2007. *Emerging Infectious Diseases*. 13(8):1139-1143.

117. Fouchier, R. Munster, V., Keawcharoen, J. Osterhaus, A. and Kuiken , T. Virology of avian influenza in relation to wild birds. 2007. *Journal of Wildlife Diseases*. 43(3): s7-s14.

118. Kida, H., Yanagawa, R. & Matsuoka, Y. Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infection and Immunity*. 1980.30.547: 553.