



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MIXOVIRUS AVIARES EN UN HUMEDAL DEL ESTADO DE MÉXICO A PARTIR DE AGUA Y PATOS CENTINELAS”

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

RODRIGO JESÚS BARRÓN RODRÍGUEZ

TUTOR: GARY GARCÍA ESPINOSA

COMITÉ TUTORAL: GERARDO SUZÁN AZPIRI

ELIZABETH LOZA RUBIO

MÉXICO, D.F.

2009



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.

DEDICATORIAS

Mi trabajo lo ofrezco a Dios por darme vida, permitirme experimentar este mundo tan maravilloso y darme lo necesario y más para disfrutarlo.

A mi Vero y mi Diego, mi familia, por impulsarme a siempre ser mejor y superarme; por inspirarme para realizar de la mejor manera las cosas, lograr mis metas y vivir al máximo; y por apoyarme en mis decisiones y locuras.

A mis padres por crearme y hacer de mí el ser que soy, por darme un hogar ideal, y formarme en una familia amorosa. Por enseñarme a lograr mis metas esforzándome y haciendo las cosas lo mejor posible.

A mis hermanos Leslie y Julio por estar ahí siempre, y por su incondicional amor.

A mi primo Arturo, ya que en el tiempo que me regalo aquí y al irse, aprendí y comprendí muchas cosas.

Y a todos los que no menciono, como profesores que han contribuido a mi formación, y amigos que me han apoyado.

AGRADECIMIENTOS

Primero a mis padres por darme todo para que yo llegara a este punto, a ser lo que soy.

A mi tutor Gary García por su apoyo y enseñanzas durante más de 4 años. Y por impulsarme a realizar esta investigación.

A la Secretaría del Medio ambiente y recursos naturales por su logística para que este estudio se llevara a cabo. Y al convenio SEMARNAT-UNAM por el financiamiento de este estudio.

A la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) por permitir la realización de este estudio en sus instalaciones.

Al CONACYT por su apoyo durante mi estudio proporcionándome una beca.

Al M. en C. Salvador Ibarra y la E.M.V.Z. Laura por su apoyo en la logística y las actividades de campo de este trabajo.

Al Dr. Gerardo Suzán Azpiri, mi tutor, por sus comentarios y enseñanzas.

A mi tutora la Dra. Elizabeth Loza Rubio y al Instituto Nacional de Investigaciones forestales agrícolas y pecuarias por abrirnos las puertas de su laboratorio, y en especial a mi tutora por apoyarme en gran medida.

Al biólogo David Colón Quezada por el apoyo en el reconocimiento del humedal y por compartir su experiencia de campo con nosotros.

Agradezco en especial al E.M.V.Z. Julio J. Barrón Rodríguez, mi hermano, y a el Sr. Jesús Barrón Barrios, mi padre, por haberme apoyado siempre en el trabajo de campo.

Al Dr. Juan Joel Mosqueda por sus enseñanzas y consejos.

Por último al Dr. Carlos Gutiérrez, al Dr. Carlos Vázquez y a la Dra. Frida Salmerón por sus consejos y aportaciones en la redacción y presentación de esta tesis.

RESUMEN

El influenzavirus A (IA) y el paramixovirus 1 (PMV1) infectan aves silvestres y domésticas. El hábitat natural para estos virus son los humedales y los principales reservorios son los patos, gansos y cisnes (Anseriformes). La mayoría de los humedales de México alojan especies de patos. Existen varios reportes en Norteamérica de aislamientos y serología en este tipo de aves bajo estas condiciones, pero ninguna en áreas cercanas al trópico. La biodiversidad de estos virus en humedales mexicanos se desconoce. Este trabajo buscó la presencia de los PMV1 e IA en un humedal del centro del país, que constituye parte de la ruta central de migración y sitio de estancia de anátidos silvestres en la temporada otoño-invierno. En un humedal del Estado de México se introdujo un grupo de patos como centinelas en el periodo de septiembre de 2007 hasta marzo de 2008, época de estancia de las aves migratorias. Cada veintiún días se realizaron observaciones de las especies y sus densidades en el humedal, se realizó un examen médico general de las aves centinelas y se colectaron hisopos traqueales y cloacales, así como muestras de agua de diferentes áreas del humedal para aislamiento viral. También se colectó sangre de cada individuo para determinar títulos séricos. La presencia e identificación viral se realizó por medio RT-PCR. El IA y el PMV1 fueron aislados en los meses de mayor densidad aviar, comprobando que estos agentes circulan con mayor facilidad en comunidades altamente pobladas. Los títulos serológicos se incrementaron de acuerdo a la circulación del virus en los patos, teniendo una respuesta más rápida y elevada en re-exposiciones. Este es el primer estudio realizado en un humedal cercano al trópico que evidencia la presencia del IA y PMV1, y el primer reporte de IA y PMV1 realizado en un ambiente silvestre en México.

Palabras clave: Influenzavirus A, paramixovirus 1, anseriformes, patos centinelas, humedal, títulos séricos.

ABSTRACT

Influenzavirus A (IA) and paramixovirus 1 (PMV1) infect wild and domestic birds. The natural habitat for IA and PMV1 are wetlands and the main reservoirs are ducks, geese and swans (*Anseriformes*). Most of wetlands in Mexico lodge duck species. There are several AI and PMV1 reports of isolations and serology of *Anseriformes* in wetlands of North America but none in near tropic areas. The biodiversity of AI and PMV1 in Mexican wetlands is unknown. This study searches the presence of AI and PMV1 in a wetland of central Mexico, that constitute part of the migratory central route and station of wild anatic species in the fall-winter season. In a wetland of Estado de Mexico a group of sentinel ducks was introduced during the migratory season, from September 2007 to march 2008. Every twenty one days observations of species and its densities were made; a clinic exam of sentinel ducks was performed; tracheal and cloacal swabs and water samples were collected for virus isolation. Also blood samples of sentinel ducks were taken for serology evaluation of antibody titers. The presence and identification of virus were determined by RT-PCR. AI and PMV1 were isolated in the period of higher avian density, probing that these virus circulate easier in environments with high densities of species. The serological titers were incremented according to the virus circulation in ducks, showing a faster and higher immunological response to virus re-exposition. This is the first study performed in a near tropic wetland that evidence the presence of AI and PMV1, and the first report of AI and PMV1 made in wild environment in Mexico.

Key words: Influenzavirus A, paramixovirus 1, *Anseriformes*, sentinel ducks, wetland, serological titers.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DEL INFLUENZAVIRUS A Y PARAMIXOVIRUS 1	1
MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	2
LAS AVES COMO RESERVORIOS Y LA ECOLOGÍA DE LOS INFLUENZAVIRUS A Y PARAMIXOVIRUS 1	3
HIPÓTESIS	4
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS PARTICULARES	5

REVISIÓN DE LITERATURA 6

JUSTIFICACIÓN	7
-------------------------	---

MATERIAL Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO	9
ANIMALES CENTINELAS.	9
DISEÑO MUESTRAL	11
MUESTRAS DE SANGRE	11
AISLAMIENTO VIRAL	12
PRUEBA DE HEMOAGLUTINACIÓN	14
SEROLOGÍA	14
NOTIFICACIÓN DE RESULTADOS A SAGARPA	15
RT-PCR	15

RESULTADOS

OBSERVACIONES DE AVES	18
AISLAMIENTOS	18
SEROLOGÍA	22
RT-PCR	26

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

AISLAMIENTOS VIRALES	30
TÍTULOS DE ANTICUERPOS	33
RESULTADOS DE RT-PCR	35

REFERENCIAS 38

Lista de cuadros 44

Lista de figuras 45

INTRODUCCIÓN

Existen en la actualidad 2 virus de importancia responsables de enfermedades respiratorias en aves, el influenzavirus A y el paramixovirus 1 (enfermedad de Newcastle). Ambos provocan severos daños económicos en la industria avícola y se encuentran infectando a un amplio número de especies aviares en la naturaleza. Estos agentes comparten características físico-químicas que, en algunos casos, les confieren la capacidad de ser patógenos (Saif 2003).

CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DEL INFLUENZAVIRUS A Y PARAMIXOVIRUS 1.

El virus causante de la influenza aviar pertenece a la Familia *Orthomyxoviridae*, Género *Influenzavirus A*. Tiene un diámetro de 80 a 120 nm, ARN de cadena sencilla de sentido negativo segmentado en 8 fracciones codificantes cubierto por una cápside, de simetría helicoidal, envuelto en una capa fosfolipídica y contiene glucoproteínas que se proyectan desde la envoltura y poseen actividad hemoaglutinante y de neuraminidasa. El influenzavirus A se divide en subtipos de acuerdo con la antigenicidad de sus hemoaglutininas (H) y neuraminidasas (N) (Knipe *et al.*, 2001). Hasta la fecha se han distinguido 16 H (H1-H16) y 9 N (N1-N9). Este virus provoca pérdidas considerables en la avicultura debido a la mortalidad, disminución en los parámetros productivos y el comercio de aves afectadas, siendo las variantes de alta y moderada virulencia las involucradas en estos casos (Saif 2003; Ritchie 1994).

Por otro lado, el paramixovirus 1 (virus de Newcastle), pertenece a la Familia *Paramyxoviridae*, Subfamilia *Paramyxovirinae*, Género *Avulavirus*, serogrupo Paramixovirus aviar 1 (PMV1). Es un virus envuelto con ARN no segmentado de cadena sencilla, negativa, helicoidal y cápside simétrica, de forma esférica a pleomórfica. Los viriones tienen un diámetro de 100 a 500 nm, su superficie está cubierta con proyecciones con acción hemoaglutinante y de neuraminidasa. Este virus provoca las pérdidas más grandes en la avicultura mundial (Knipe *et al.*, 2001; ICTV 2009; Saif 2003).

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

La capacidad infectante de estos dos agentes, se debe a la presencia de hemoaglutininas y neuraminidasas en la superficie de su envoltura lipídica.

Las hemaglutininas poseen tres funciones conocidas:

1. Se unen a los receptores de la superficie celular que poseen ácido siálico permitiendo la adhesión del virión a la célula.
2. Son responsables de la penetración del virus al citoplasma celular mediante la fusión de la membrana con la partícula viral formando una membrana endosomal, la consecuencia es la liberación de la nucleocápside viral dentro del citoplasma (en el virus de influenza aviar).
3. Son antígenos del virus contra los cuales se producen los anticuerpos neutralizantes.

La neuraminidasa permite la liberación de nuevas partículas virales, al remover el ácido siálico presente en los receptores de la membrana celular, a los cuales se encuentra adherido el virión. Esta proteína posee importancia inmunológica y diagnóstica al actuar como determinante antigénico.

El paramixovirus 1 posee una proteína de fusión denominada F. La cual media la penetración viral mediante la fusión entre la envoltura del virión y la membrana plasmática de la célula huésped. Este evento ocurre en un pH neutral. Como consecuencia de este proceso la nucleocápside es liberada al citoplasma.

Las glucoproteínas de superficie (H y N) de los virus de influenza aviar exhiben una gran variabilidad en su secuencia de aminoácidos debido a dos procesos. En el primero, los virus pueden recombinarse *in vivo* entre miembros de un tipo homotípico, dando como resultado la aparición de un nuevo subtipo de virus que contiene una H o una N distinta. El segundo se debe a cambios puntuales en la secuencia de aminoácidos, debidos a mutaciones puntuales que provoca la retrotranscriptasa viral.

Por estas características, los influenzavirus A y paramixovirus 1 tienen una amplia variedad de huéspedes susceptibles y reservorios, incluyendo a las aves y varias especies de mamíferos, incluyendo al humano (Knipe *et al.*, 2001).

LAS AVES COMO RESERVORIOS Y LA ECOLOGÍA DE INFLUENZAVIRUS A Y PARAMIXOVIRUS 1

El influenzavirus A y el paramixovirus 1 infectan a una amplia variedad de especies aviarias que ocupan hábitats acuáticos, especialmente a las aves silvestres de los Géneros Anseriformes, Ciconiiformes y Pelecaniformes (Jonassen y Handeland 2007; Pasick *et al.*, 2007; Dalessi 2007; Wan *et al.*, 2004; Glaser *et al.*, 1999).

Las aves del Orden Anseriformes, representado por los patos, gansos y cisnes, son reservorios de ambos virus, y para el caso del influenzavirus A son los principales reservorios (Brown *et al.*, 2007; Hanson *et al.*, 2002). Estas aves están ampliamente distribuidas en el mundo. Cerca del 25% al 30% de los anátidos en el hemisferio Norte portan el virus de influenza (Ritchie *et al.*, 1994). El virus se ha aislado de 20 de las 42 especies de patos, gansos y cisnes nativos de Norteamérica (Stalknecht *et al.*, 1990 y 1997). En estas especies la infección es generalmente asintomática, pero pueden presentar cuadros de depresión severa, signos nerviosos y mortalidad, sobre todo en aves jóvenes y algunas especies susceptibles (Brown, *et al.*, 2006; Pantin-Jackwood y Swayne 2007).

La infección con paramixovirus 1 e influenzavirus A tiene lugar en tracto respiratorio superior y tracto intestinal, eliminando grandes concentraciones de viriones vía aerosoles y heces que contaminan el aire y el agua, siendo la ruta de transmisión principal en ambientes acuáticos de tipo fecal-oral por medio del agua contaminada (Brown *et al.*, 2007; De Marco *et al.*, 2003). Para el caso de *Anseriformes* este tipo de transmisión aplica en su totalidad pues estas aves obtienen su alimento vadeando con el pico el agua y el fondo en busca de insectos, larvas, gusanos, raíces y algunos tubérculos y semillas. Con base en los estudios de Brown *et al.*, (2008), los virus pueden persistir viables en el agua por periodos de 2 hasta 6 meses en condiciones de laboratorio, dependiendo de la temperatura y la salinidad, que tienen un efecto inverso y adverso sobre la persistencia del virus. Con lo anterior, deduce

que en las aves acuáticas el virus siempre estará dispersándose de manera constante en ambientes acuáticos por periodos prolongados.

En México existen varios ambientes acuáticos, en los que habitan especies de Anseriformes. Uno de estos ambientes es la cuenca del Lerma, constituido por un grupo de cuerpos de agua a los que cada año arriban en densidades elevadas alrededor de 12 especies de anátidos migratorios, que son la cerceta ala azul (*Anas discors*), cerceta ala verde (*Anas crecca*), cerceta canela (*Anas cyanoptera*), el pato cucharón norteno (*Anas clypeata*), el pato golondrino (*Anas acuta*), el pato friso (*Anas strepera*), el pato texano (*Anas fulvigula*), pato chalcuán (*Anas americana*), el pijije canelo (*Dendrocygna bicolor*), el pato boludo menor (*Aythya affinis*), pato coacoxtle (*Aythya valisineria*) y el pato enmascarado (*Nomonyx dominicus*) (Vázquez-Rivera 2004). Se han aislado influenzavirus A de algunas de estas especies de patos migratorios en Canadá y E.U.A. Cabe mencionar que existen especies endémicas como el pato mexicano (*Anas diazi*) del cual se desconoce su papel como reservorio y huésped del influenzavirus A.

Alrededor de estos cuerpos de agua encontramos poblaciones humanas que poseen animales domésticos, como cerdos, ovinos, algunos bovinos, equinos y en su mayoría aves como gallinas y pavos principalmente y con menor frecuencia patos. Estos asentamientos humanos se encuentran en estrecho contacto con los humedales, y en muchos casos el agua de estos ambientes es empleada para actividades agrícolas y pecuarias.

Dadas las características mencionadas, estos escenarios ofrecen un ambiente ideal para la preservación, replicación y propagación del influenzavirus A y el paramixovirus 1. En México no se tiene registro de los influenzavirus A y paramixovirus 1 asociados a estos ambientes y a las especies que infectan.

HIPÓTESIS

Las características del humedal del Estado de México permiten la presencia de influenzavirus A y paramixovirus 1 aviares similares a los reportados en Estados Unidos y Canadá.

Los influenzavirus A y paramixovirus 1 aislados de los patos domésticos y del agua son los mismos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de influenzavirus A y paramixovirus 1 aviáres presentes en un humedal del Estado de México a partir de patos domésticos centinelas y el agua del hábitat.

OBJETIVOS PARTICULARES

Aislar por medio de embrión de pollo libre de patógenos específicos los influenzavirus A y paramixovirus 1 presentes en hisopos de tráquea y cloaca de los patos.

Aislar por medio de embrión de pollo libre de patógenos específicos los influenzavirus A y paramixovirus 1 aviáres presentes en agua de las regiones de tule, pastos, lirio, claros y orilla del bordo, a partir de muestras tomadas con hisopos.

Determinar si el agua asociada a ciertas regiones específicas del bordo posee características que favorecen la concentración y conservación de influenzavirus A y paramixovirus 1.

Registrar las condiciones de salud de los patos a muestrear en cada etapa del muestreo.

Determinar si los virus presentes pertenecen a los influenzavirus A o paramixovirus 1 a través de RT-PCR.

REVISIÓN DE LITERATURA

En varios estudios y reportes realizados se ha encontrado que las especies de aves en las que más aislamientos de influenzavirus A se realizan son patos silvestres. El paramixovirus 1 también ha sido frecuentemente aislado de estas especies, aunque existe menos información de este agente en estos animales. En algunas de estas especies se han realizado aislamientos o seroconversiones de influenzavirus A y paramixovirus 1.

Stalknecht (1990) aisló 28 cepas del virus de influenza aviar a partir de 605 *A. discors* (prevalencia 3.1%), 75 *Dendrocygna guttata* (prevalencia 2%), 375 *A. strepera* y 334 *A. crecca* (prevalencia 0.4%) encontrando 9 hemoaglutininas y 9 neuraminidasas, en un estudio realizado en Louisiana, E.U. Pasick *et al.*, (2005) aisló virus H5N2 y H5N9 de 704 patos silvestres en Columbia Británica, el primero fue encontrado en una explotación de patos domésticos a 120 Km. de su origen.

También se han reportado aislamientos y casos de brotes de influenza aviar en aves, principalmente patos migratorios infectados y portadores del virus, en varias entidades de China, y países del Norte de Europa (Fouchier *et al.*, 2003; Fereidouni *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Normile 2006; Feare 2007; Pasick *et al.*, 2007; Dalessi *et al.*, 2007; Jonassen y Handalend 2007).

Un factor importante para que los virus sean mantenidos en un ambiente acuático determinado es una alta población de especies susceptibles. Estos escenarios se dan durante la temporada de migración de varias especies aviares hacia el sur, cuando muchos individuos de diferentes especies se congregan en los humedales a lo largo de las rutas migratorias, conviviendo en estrecho contacto. Estos individuos servirán como huéspedes donde los virus se replicarán y eliminarán en grandes cantidades al agua donde conviven y se alimentan una gran cantidad de aves. De esta manera el ciclo de infección persistirá (Slemons *et al.*, 2003).

Hubálek (2004) menciona que todos los subtipos antigénicos (H1-H15 y N1-N9) son perpetuados en aves acuáticas migratorias, sobre todo en patos y gansos, dónde el índice de

aislamiento va desde 0.3% hasta 30%. Para el caso del virus de Newcastle (VEN) menciona que las aves afectadas pueden transportarlo largas distancias, ya que los huéspedes recuperados y los portadores eliminan el agente por periodos prolongados. El paramixovirus 1 se ha encontrado en anseriformes y pelecaniformes causando afecciones manifestadas por comportamientos aberrantes, signos nerviosos y muerte (Wan *et al.*, 2004; Glaser, *et al.*, 1999).

JUSTIFICACIÓN

En nuestro país existen varios humedales que albergan varias especies de Anseriformes, principalmente patos, y cada año arriban a estos lugares varias especies migratorias, estableciendo un ecosistema ideal para la presencia del influenzavirus A y el paramixovirus 1.

En México el único reporte de influenzavirus A existente es el aislamiento de un subtipo H7N3 a partir de un ejemplar de cerceta canela durante un estudio realizado en aves migratorias en el estado de México en el 2006. En este estudio se colectaron hisopos traqueales y cloacales de cadáveres de varias especies de patos migratorios, durante la época de actividad cinegética que se realiza cada invierno (noviembre-febrero) cuando las aves migratorias arriban y permanecen en los humedales nacionales.

En nuestro país se desconoce la situación de estos virus en este tipo de ambiente, durante qué época y en qué especies de aves acuáticas se presentan. Además de las especies de anátidos migratorias, existen residentes que podemos encontrar todo el año en los humedales, como el pato tepalcate (*Oxyura jamaicensis*) y el pato mexicano (*Anas diazi*), que posiblemente sean hospedadores para los virus, y contribuyan a su preservación en estos ambientes. Los datos y estudios de la presencia de agentes infecciosos en especies residentes son inexistentes.

El presente estudio buscó los subtipos de influenzavirus A y paramixovirus 1 que residen en forma natural en los humedales del Estado de México, empleando patos domésticos (*Anas platyrhynchos domesticus*) como método de captación (centinelas) para detectar la

presencia de virus en el ambiente. Tomando como área de estudio un humedal artificial que es hábitat de las especies de aves migratorias ya mencionadas. Este humedal comparte la avifauna de las ciénagas del Lerma, como son cercetas, patos, íbices, garzas, grullas y gallaretas entre otros.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio. El estudio se realizó en el bordo “las Maravillas”, un humedal artificial localizado dentro de la región de la cuenca del Lerma, en el Estado de México (Figura 1). Posee un clima templado subhúmedo con lluvias en verano (junio-agosto), con una precipitación media anual de 800 a 1200 mm, y una temperatura media anual de 12 a 16 °C. En él encontramos las especies *Anas diazi* y *Oxyura jamaicensis* que son residentes, y durante el periodo comprendido entre los meses de octubre-marzo a las especies *Anas discors*, *Anas crecca*, *Anas cyanoptera*, *Anas acuta*, *Anas clypeata*, *Anas americana*, *Anas strepera* y *Anas fulvigula*, que son migratorias (Vázquez-Rivera 2004).

Animales centinelas. Se obtuvieron 11 patos (*A. platyrinchus*) de un año de edad libres de influenza aviar, Newcastle y salmonelosis. Los patos se identificaron por medio de brazaletes de plástico numerados que se colocaron en el tarso izquierdo de cada pato. Se formaron cuatro grupos. Tres grupos de tres patos y un grupo de dos para la toma de muestras de hisopos traqueales y cloacales. Los animales fueron mantenidos en una unidad de aislamiento proporcionándoles agua y comida. Las aves fueron evaluadas en forma previa a su liberación, realizándoles un examen médico general registrando peso y condición corporal de cada individuo y colectando muestras de sangre para determinar los títulos serológicos contra influenzavirus A (IA) y paramixovirus 1 (PMV1). Los patos fueron liberados en el área de estudio en el mes de septiembre del 2007 en un corral de 445 m², localizado en el claro central del humedal donde se congregaban las mayores densidades de aves. Las aves fueron liberadas en buenas condiciones de salud con una buena condición corporal (2 y 3 de 5 de calificación basada en la masa de los músculos pectorales), con pesos de 1550 hasta los 2100 gramos y desprovistos de títulos de anticuerpo contra influenzavirus A y paramixovirus 1. Cuatro patos murieron durante el estudio en los meses de noviembre-enero debido a las condiciones ambientales adversas, como lo confirmó la necropsia de cada pato.



Figura 1. Ubicación geográfica del área de estudio. Como se puede apreciar, el bordo “Las Maravillas” (☐ Área de estudio) se encuentra ubicado en el Estado de México dentro de la región de la cuenca del Lerma-Chapala [—]. Fuente Google earth.

Diseño muestral

Posterior a la introducción de los patos en el humedal las aves se mantuvieron en el bordo desde septiembre, antes de la llegada de las especies migratorias, hasta marzo al término de la migración, permaneciendo en contacto con el agua y las aves que habitaban y se congregaban en el bordo. Semanalmente se realizó identificación de especies y sus densidades en el humedal de forma observacional.

Cada 21 días se colectaron muestras de:

Patos centinelas: se colectaron muestras de hisopos traqueales y cloacales de los patos centinelas preservándolas en medio de transporte comercial para virus UTM-RT de industrias COPAN conteniendo solución balanceada de sal de Hank suplementada con albúmina sérica bovina, cysteina, gelatina, sucrosa, ácido glutámico, vancomicina, anfotericina B, colistina y rojo fenol como indicador de pH (Copan Italia, Brescia). Las muestras traqueales y las muestras cloacales se guardaron por grupo de patos en tubos separados.

Agua: Se colectaron muestras e hisopos de agua de las regiones de tule, pastos, claros y orilla del humedal preservándolas en medio de transporte comercial UTM-RT (COPAN). Las regiones fueron 1) agua de las isletas de tule, donde se tomaron muestras del interior (AZIT), de la orilla de la isleta de tule (AOZT) y a tres metros del manchón de tule (AZT3m); 2) de la región de pastizal del bordo (AZP), donde descansaba una gran cantidad de aves; 3) agua del claro central del bordo (ACC) donde se congregaba la mayor cantidad de aves; 4) agua del cerco de los patos centinelas (AZTP), localizado a la orilla del claro central.

Muestras de sangre. Se colectaron muestras de sangre de los patos en jeringas de 3 ml sin anticoagulante para la obtención de sueros. Estos fueron empleados para la determinación de títulos serológicos contra influenzavirus A y paramixovirus 1.

Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio de Patología Aviar del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para ser almacenadas en refrigeración y trabajarlas al día siguiente.

En cada muestreo se realizó un examen médico general a cada pato centinela registrando su peso y condición corporal.

Se realizaron dos muestreos emergentes, debido a los resultados de los aislamientos en embrión de pollo con las muestras de patos de noviembre y de agua de febrero. Estos muestreos se realizaron una semana después del muestreo original. En la figura 2 se muestra esquemáticamente las actividades realizadas en el bordo, basadas en la estancia de las aves migratorias en el área de estudio.

Aislamiento viral. Los viales con los hisopos fueron homogenizados en vortex por 30 segundos para desprender los viriones. Posteriormente se retiraron los hisopos y se centrifugaron los tubos a 150 x g (1500 rpm) por 15 minutos. Se recolectó el sobrenadante con jeringas de 5ml. para ser filtrado con membranas durapore de 0.45 µm (Millipore) a pequeños frascos viales de vidrio. A estos se les añadió 0.2 ml. de antibiótico-antimicótico conteniendo penicilina G sódica 10 000 UI/ml, estreptomycin 10 000 µg/ml y anfotericina B 25 mg/ml (GIBCO, Invitrogen corp.). Por cada muestra se inocularon 3 embriones ALPES I (embriones de pollo libres de patógenos específicos ALPES I de 9 a 11 días de edad de industrias ALPES 7 Norte 416, Tehuacan Puebla, CP 75700, México) vía cavidad alantoidea con 0.2ml. Para el grupo control se inocularon 3 embriones con medio de transporte (COPAN). Los embriones se incubaron a 37.7°C y 55% de humedad relativa (incubadora Jamesway o River Hatchery Systems) y se ovoscopiaron diariamente para detectar mortalidad en las primeras 72 hrs. Los embriones muertos en las primeras 24 hrs. posteriores a la inoculación fueron eliminados. Se recolectó líquido alantoideo de embriones muertos a partir de las 48 hrs. y vivos hasta las 72hrs. postinoculación para realizar la prueba de hemoaglutinación (HA) y un pase inoculando 0.2 ml de líquido alantoideo vía cavidad alantoidea en embriones de 10 días de edad. El procedimiento a seguir con estos embriones fue el mismo que para los anteriores. Las muestras positivas a

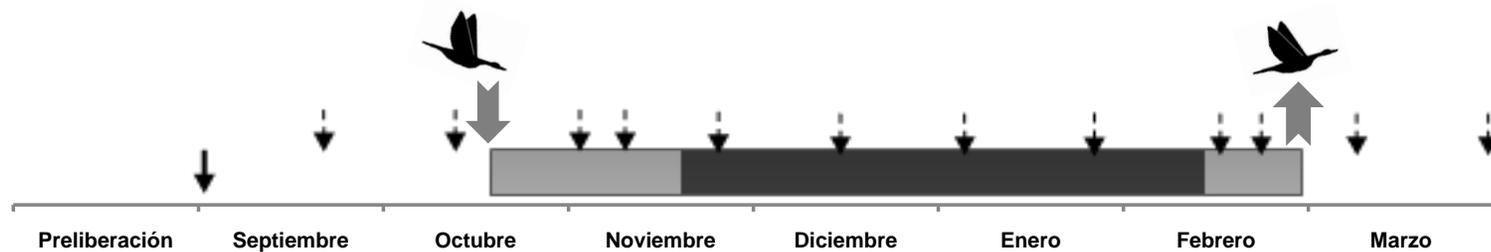


Figura 2. Diseño muestral y actividades realizadas en el humedal durante el periodo de estudio. Se liberó un grupo de patos domésticos de la raza Pekín al principio del mes de septiembre [↓] en el bordo. Cada 21 días se realizó un examen médico general y se colectaron muestras de hisopos cloacales, traqueales y muestras de sangre de los patos, así como muestras de agua [↓]. Cada semana se evaluó de manera cualitativa mediante observación las especies de aves presentes en el bordo y sus densidades. El estudio comprendió desde antes de la llegada de las especies migratorias (□), el periodo de estancia de las aves migratorias (■), incluyendo los dos meses de mayor riqueza de especies (■), hasta el final de la migración, cuando todas las especies migratorias retornan a su territorio de reproducción, y sólo quedan aves residentes en el humedal.

HA fueron sometidas a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación para PMV1 e IA y RT-PCR para determinar el tipo o cepa de influenza A o paramixovirus 1.

Prueba de Hemoaglutinación (HA). En una placa de acrílico se colocó una gota (0.05 a 0.1 ml) del líquido alantoideo de cada embrión inoculado para aislamiento. Se agregó una gota (0.05 a 0.1 ml) de eritrocitos de pollo lavados con PBS 1x, a una concentración de 2 %. Homogenizando la mezcla con movimientos giratorios suaves, se observó en unos minutos la hemoaglutinación (NOM-044-ZOO-1995; Saif 2003). Las muestras que resultaron positivas a la hemoaglutinación fueron sometidas a la prueba RT-PCR para identificar el gen M de influenza A y el gen M del paramixovirus 1.

Serología. Las muestras sanguíneas sin anticoagulante obtenidas se dejaron reposar por 24 horas a temperatura ambiente para obtener la mayor cantidad de suero. Estos se vertieron en una placa de 96 pozos de fondo plano para facilitar su manejo. Con antígeno preparado conteniendo 4 unidades hemoaglutinantes para IA y 8 unidades para ENC, en una placa de 96 pozos, se colocaron 50 µl utilizando una fila por cada suero desafiado. Se emplearon placas de fondo “U” para paramixovirus 1 y fondo “V” para IA. Se agregaron 50 µl de suero en la primera columna, y se realizaron diluciones dobles transfiriendo 50µl al pozo siguiente, homogenizando por pipeteo cada dilución por lo menos 7 veces. En el último pozo se eliminaron los 50 µl restantes. Se dejó incubar la mezcla por 30 minutos. Se agregaron 50 µl de eritrocitos de pollo lavados a una concentración de 1 % para IA y 0.7 % para paramixovirus 1. La mezcla incubó por 30 minutos y posteriormente se realizó la lectura, tomando como resultado la última dilución que haya presentado sedimentación completa de glóbulos rojos.

Con los títulos serológicos de cada muestreo se obtuvo la media geométrica (MGT) y un intervalo de confianza (IC) de 99% (0.01)

Notificación de resultados a SAGARPA

Los líquidos alantoideos positivos a la prueba de HA fueron remitidos al laboratorio de CPA (Comisión México-U.S. para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades

exóticas de los animales) acatando lo establecido por legislación en sus normas oficiales mexicanas NOM-044-ZOO-1995-Campaña Nacional contra la influenza aviar y NOM-013-ZOO-1994-Campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle velogénico (paramixovirus 1). Los resultados de serología de los patos centinelas obtenidos durante el periodo de estudio fueron reportados al SIVER (sistema de vigilancia epidemiológica en vida silvestre) de SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria).

RT-PCR

Extracción. Para la extracción del ARN viral se utilizó el paquete de columnas para ácidos nucleicos virales de invitrogen (PureLink RNA-DNA viral kit, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA 92008 USA) siguiendo el manual de instrucciones del producto.

Iniciadores. Para el diseño de los iniciadores empleados en este estudio se utilizaron secuencias de ARN genómico del gen matriz (M) y del gen de la hemaglutinina (HA) subtipos 5 y 7 del virus de influenza obtenidas del GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con las cuales se realizó un alineamiento múltiple con la herramienta CLUSTAL W disponible en la red (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Con los resultados del alineamiento múltiple se evidenciaron las regiones de identidad sobre las que se diseñaron las secuencias de los iniciadores. En el cuadro 1 se enlistan los iniciadores empleados, secuencias, fuente u origen y tamaño del fragmento amplificado.

Para el diagnóstico del paramixovirus 1 y el gen HA subtipo 5 del virus de influenza A en muestras se emplearon iniciadores obtenidos de los Protocolos de Pruebas de Laboratorio de los Servicios Veterinarios Nacionales (National Veterinaries Services Laboratories Testing Protocol NVSLTP of USDA, Ames, IA 50010, USA).

A todos los iniciadores se les realizó una rigurosa serie de análisis, evaluando la formación de horquillas, homodímeros y heterodímeros mediante la herramienta

oligoanalyzer 3.1 disponible en la red por el Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>).

Reacción de RT-PCR. Las muestras positivas a la prueba de hemoaglutinación se sometieron a dos RT-PCR para determinar el virus o los virus aislados. Estas reacciones amplificaron el gen M del influenzavirus A y el gen M del paramixovirus 1.

Las muestras positivas a la identificación del gen M de IA por RT-PCR fueron sometidas a una segunda reacción para identificar el subtipo de la hemoaglutinina (H) involucrada. Para esto se emplearon iniciadores que amplificaran los subtipos H5 y H7.

Se empleó una última reacción de RT-PCR para amplificar la mayor parte del gen HA para su secuenciación. Con la secuencia del gen HA obtenida se realizaron los análisis correspondientes para la identificación del probable linaje del virus.

Para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR se empleó el equipo “One step RT-PCR” de Qiagen. Los productos de las reacciones fueron revelados en geles de agarosa al 2%.

Todos estos procedimientos antes descritos fueron realizados en un Gabinete de seguridad Biológica clase II de la marca NUAIRE tipo A/B3 o en un gabinete de PCR.

Cuadro 1. Iniciadores empleados en el estudio

Secuencia de Iniciadores	Gen de identidad	Tamaño del producto (pb)	Fuente/Diseño
SECUENCIAS DE INICIADORES EMPLEADOS EN EL DIAGNÓSTICO DE INFLUENZAVIRUS A Y PARAMIXOVIRUS 1			
AGT GAT GTG CTC GGA CCT TC CCT GAG GAG AGG CAT TTG CTA	M de Paramixovirus 1	120 pb	National Veterinaries Services Laboratories Testing Protocol
GAG TCT TCT AAC CGA GGT CG GGA TCA CTT GAA TCG CTG C	M de Influenzavirus A	741 pb	Diseñado mediante alineamiento múltiple de 71 secuencias del gen
ACG TAT GAC TAT CCA CAA TAC TCA AGA CCA GCT ACC ATG ATT GC	H5 de Influenzavirus A	161 pb	National Veterinaries Services Laboratories Testing Protocol
CAT TCA TAG CCC CTG ACA G CCT GTG ATC TGA TCT ATT GC	H7 de Influenzavirus A	390 pb	Diseñado mediante alineamiento múltiple de 35 secuencias del gen
SECUENCIAS DE INICIADORES EMPLEADOS PARA SECUENCIACIÓN			
GAC GGT CAC ACA TGC TCA GCC ATC CTC CTT CTA TGA ATC C	H5 de Influenzavirus A	949 pb	Diseñado mediante alineamiento múltiple de 40 secuencias del gen
CAC CAT GCT GTG GCA AAT G GTG TTG TTC CTT ATG CTC TCC A	H7 de Influenzavirus A	1387 pb	Diseñado mediante alineamiento múltiple de 37 secuencias del gen

RESULTADOS

OBSERVACION DE AVES

Las aves migratorias comenzaron a arribar al bordo a mediados del mes de octubre, cuando los primeros grupos de cercetas ala verde y ala azul se avistaron. A partir de esta fecha el número de aves y especies fue en aumento. Los meses de noviembre, diciembre, enero y principios de febrero fueron la época de mayor riqueza en el humedal, encontrando 9 especies (Figuras 3 y 4). Posteriormente el número de aves fue disminuyendo rápidamente. Al comenzar el mes de marzo sólo quedaban las aves residentes (*A. diazi*, *O. jamaicensis* y escasas cercetas *A. discors* y *A. crecca*).

AI SLAMIENTOS

El primer aislamiento viral se realizó en el mes de noviembre del 2007. En este muestreo los hisopos traqueales y cloacales del grupo 1 así como los cloacales de los grupos 2 y 4 fueron positivos al aislamiento. Al realizar el pase en embrión de pollo de 10 días, los líquidos alantoideos de las muestras de tráquea y cloaca de los grupos 1 y 2, los de tráquea del grupo 3 y los de cloaca del grupo 4 fueron positivos. En el muestreo emergente realizado una semana después, el resultado fue positivo en las muestras de tráquea y cloaca del grupo 1 y las de cloaca del grupo 3, tanto al aislamiento como en el pase.

El tercer aislamiento en los patos fue realizado en enero. Las muestras cloacales del grupo 3 fueron positivas al aislamiento, pero al realizar el pase los líquidos alantoideos de los grupos 1, 3 y 4 provenientes de cloaca fueron positivos (Cuadro 2 y Figura 11).

En el agua los aislamientos se realizaron a finales de enero, el día 27, cuando una muestra de agua asociada al tule del claro central del humedal fue positiva en el pase. El segundo aislamiento en agua fue realizado el día 3 de febrero, en un muestreo emergente de agua. El aislamiento se hizo a partir del agua del claro central del humedal, y fue positivo tanto en el aislamiento como al pase.



Fotografía tomada por Gary García Espinosa

Figura 3. Área de estudio mostrando la riqueza de especies aviarias existentes durante el mes de diciembre 2007. En la imagen se observa el gran número de aves de las especies *A. diazi*, *A. discors*, *A. crecca*, *A. cyanoptera*, *A. acuta*, *A. clypeata*, *A. americana*, *A. strepera* y *A. fulvigula* congregadas en el claro central del humedal, lugar donde permaneció el grupo de patos centinelas.



Fotografía tomada por Gary García Espinosa

Figura 4. Patos centinelas en estrecho contacto con las aves silvestres en el bordo “Las Maravillas”. La imagen fue tomada en el mes de diciembre de 2007, época de mayor riqueza de especies aviarias acuáticas.

Cuadro 2. Resultados del aislamiento viral y su pase en embrión de pollo a partir de las muestras obtenidas de los grupos de patos y agua

Gpo. de patos	23/09/07	14/10/07	4/11/07	Em 11/11/07	25/11/07	16/12/07	6/01/08	27/01/08	Em agua 5/02/08	17/02/08	9/03/08	27/03/08
1			T C	T C					NA			
2			C									
3				C			C		NA			
4			C						NA			
AGUA									ACC			
Pase del aislamiento a las 72 hrs. en embrión de pollo de 10 días de edad.												
1			T C	T C			C					
2			T C									
3			T	C			C					
4			C				C					
AGUA								AZTP	ACC			

T: muestra traqueal.
C: muestra cloacal.

NA: muestras no recolectadas en esa fecha.
ACC: muestra de agua del claro central.

AZTP: muestra de agua del claro de los patos centinelas.

SEROLOGÍA

Influenzavirus A. En septiembre, cinco de los patos presentaron títulos de anticuerpos que fueron desde 0 hasta 1/64 con una media geométrica de título serológicos (MGT)=1/2.76 y un intervalo de confianza (IC 99%) de 15.56. Para el segundo monitoreo todos los centinelas mostraban niveles de anticuerpos que iban desde 1:16 hasta 1:64 y una MGT=1/25.99 con IC de 11.98. A principios de noviembre los títulos séricos de algunos individuos disminuyeron, mostrando valores desde 0 hasta 1/64 con una MGT=1/18.03 y un IC de 24.76. Estos niveles incrementaron rápidamente a la semana cuando todos los patos presentaron valores desde 1/16 hasta 1/128 con una MGT=1/38.66 y un IC = 25.13.

Para finales del mes de noviembre, los títulos descendieron con valores de 0 a 1/64 y una MGT=1/10.31 con un IC = 14.80. Ya en el mes de diciembre todos las aves volvieron a presentar anticuerpos con valores desde 1/16 hasta 1/64 y una MGT=1/20.16. En el comienzo del mes de enero los títulos serológicos mostraron un incremento importante con niveles desde 1/32 hasta 1/512, una MGT=1/107.63 y un IC de 151.63. Estos valores disminuyeron paulatinamente en los dos muestreos subsecuentes obteniendo cifras de 1/32 a 1/256 y una MGT=1/43.07 (IC=82.43) y 0 a 1/32 con una MGT=1/15 (IC=14.08) en el mes de febrero. Un nuevo aumento en los títulos de anticuerpos se presentó al inicio del mes de marzo cuando las aves centinelas mostraron valores desde 1/32 hasta 1/256 con una MGT=1/80.63 y un IC=115.43. A finales del mes las valores descendieron hasta 1/8 a 1/16 y una MGT=1/12.70 y un IC=6.87 (Cuadro 3 y Figuras 5 y 11).

Paramixovirus 1. Los títulos de anticuerpos contra el paramixovirus 1 permanecieron en 0 durante los primeros meses. En el mes de noviembre los títulos fueron desde 0 hasta 1/2 (tres patos), con una MGT=1/0.21 y un IC=0.73. Posteriormente volvieron a mantenerse en 0. Es hasta el comienzo del mes de enero, cuando cinco patos presentaron títulos positivos contra el agente, los valores fueron desde 0 hasta 1/64, con una MGT=1/14.67 y un IC=26.16. Para el siguiente muestreo los títulos habían descendido con valores desde 1/4 a 1/16 y una MGT=1/10.77 (IC=5.29). En el mes de febrero los patos presentaban valores de anticuerpos que iban de 0 hasta 1/8 con una MGT=1/3.03 y un IC=4.61. Finalmente a

Cuadro 3. Títulos serológicos de los patos centinelas contra influenza virus A y paramixovirus 1 por muestreo a lo largo del periodo de estudio

Títulos contra Influenzavirus												
	Preliberación	23-Sep-07	14-Oct-07	04-Nov-07	Em 11/Nov/07	25-Nov-07	16-Dic-07	06-Ene-08	27-Ene-08	17-Feb-08	09-Mar-08	30-Mar-08
Relación positivos:n	0:11	3:11	10:11	7:11	11:11	9:10	9:9	8:8	7:7	5:7	6:7	2:3
No. de patos por título serológico (patos=título)	8=0 3=1:2	6=0 2=1:8 1=1:16 1=1:32 1=1:64	1=insuf 4=1:16 5=1:32 1=1:64	3=insuf 1=0 1=1:8 2=1:16 1=1:32 3=1:64	2=1:16 5=1:32 3=1:64 1=1:128	2=0 6=1:16 1=1:32 1=1:64	7=1:16 1=1:32 1=1:64	2=1:32 2=1:64 1=1:128 2=1:256 1=1:512	6=1:32 1=1:256	1=insuf 1=0 1=1:16 4=1:32	1=insuf 3=1:32 1=1:128 2=1:256	1=1:8 2=1:16
MGT	0.21	2.76	25.99	18.03	38.66	10.31	20.16	107.63	43.07	15	80.63	12.7
IC 99%	0.75	15.56	11.98	24.76	25.13	14.8	13.93	151.63	82.43	14.08	115.43	6.87
Títulos contra paramixovirus												
Relación positivos:n	0:11	0:11	0:11	0:11	0:11	0:10	0:9	5:8	4:7	0:7	0:7	0:3
No. de patos por título serológico (patos=título)	11=0	11=0	1=insuf 10=0	11=0	8=0 3=1:2	10=0	9=0	1=0 1=1:2 1=1:4 2=1:34 3=1:64	1=1:4 2=1:8 4=1:16	2=insuf 2=0 1=1:4 2=1:8	1=insuf 2=0 1=1:4 2=1:8	3=0
MGT	0	0	0	0	0.21	0	0	14.67	10.77	3.03	3.17	0
IC	0	0	0	0	0.73	0	0	26.16	5.29	4.61	3.76	0

MGT: media geométrica de los títulos de anticuerpos obtenidos por muestreo.

IC: intervalo de confianza de 99% (0.01) del valor de la media geométrica de los títulos de anticuerpos.

Títulos serológicos de patos centinelas contra influenzavirus A

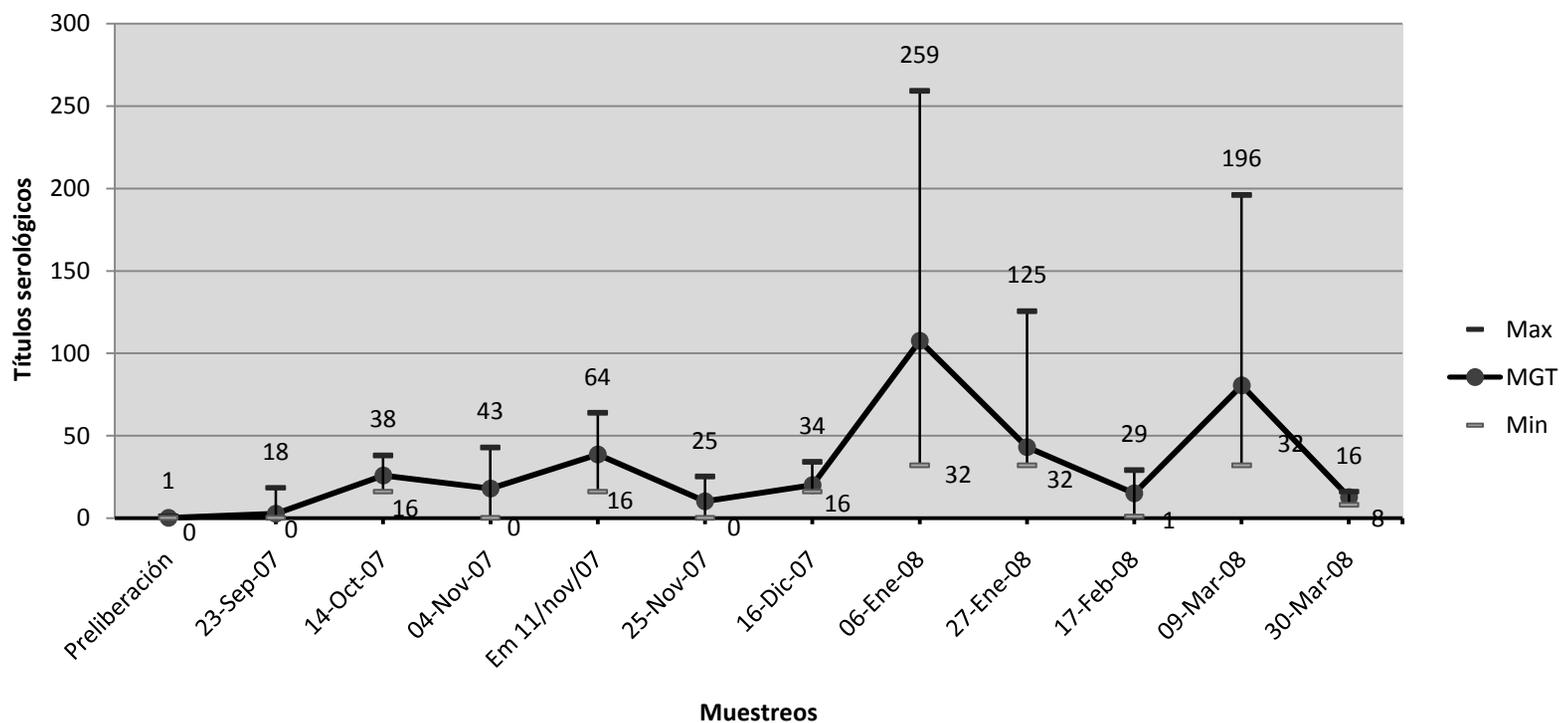


Figura 5. Títulos serológicos de los patos centinelas contra el virus de la gripe aviar. En la gráfica se muestra la media geométrica de los títulos serológicos de los patos centinelas (MGT) contra influenzavirus A, obtenidos por muestreo a lo largo del periodo de estudio. En cada muestreo se puede observar el rango mínimo y el máximo de la media geométrica, obtenido al calcular el intervalo de confianza de 99% (0.01) de cada valor. Para el caso de algunos valores mínimos, estos fueron sustituidos por el título de anticuerpos más bajo presentado en esa fecha.

Títulos serológicos de patos centinelas contra Paramixovirus 1

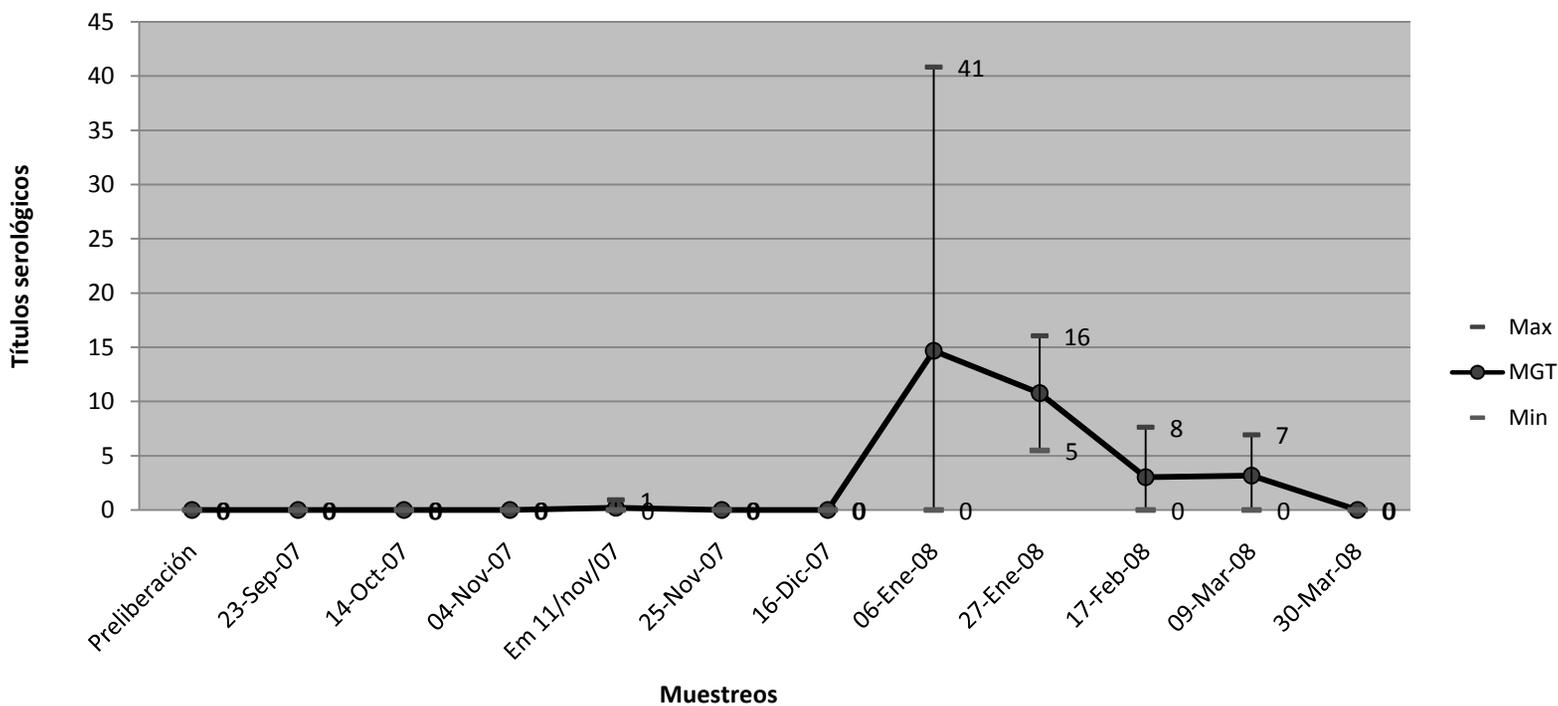


Figura 6. Títulos serológicos de los patos centinelas contra el paramixovirus 1. En la gráfica se muestra la media geométrica de los títulos serológicos de los patos centinelas (MGT) contra el paramixovirus 1 obtenidos por muestreo a lo largo del periodo de estudio. En cada muestreo se puede observar el rango mínimo y el máximo de la media geométrica, obtenido al calcular el intervalo de confianza de 99% (0.01) de cada valor. Para el caso de algunos valores mínimos, estos fueron sustituidos por el título de anticuerpos más bajo presentado en esa fecha.

principios del mes de marzo las pruebas serológicas revelaron títulos de 0 a 1/8 con un $MGT=1/3.17$ ($IC=3.76$). Al final del mes los títulos de anticuerpos contra paramixovirus 1 eran nulos en los patos centinelas (Cuadro 3 y Figuras 6 y 11).

RT-PCR

Influenzavirus A. Las muestras cloacales de los grupos 1, 2 y 4 del muestreo del 4 de noviembre del 2007 y del grupo 2 del muestreo del 11 de noviembre del 2007 así como las muestras traqueales del grupo 2 del muestreo del día 4 de noviembre fueron positivas a la amplificación del gen M del influenza virus A por RT-PCR (Figura 8).

Las muestras positivas a la RT-PCR del gen M del influenzavirus A fueron sometidas a una segunda RT-PCR para determinar si el subtipo de HA en cuestión era H5 o H7. Pero las muestras fueron negativas a la RT-PCR de diagnóstico de estas hemoaglutininas (Figuras 9 y 10).

Paramixovirus 1. Las muestras cloacales de los grupos de patos 1, 3 y 4 del muestreo del 6 de enero del 2008 y las muestras de agua de la zona del tule del cerco de los patos del muestreo 27 de enero del 2008 y del claro central del muestreo del 3 de febrero del 2008 fueron positivas a la RT-PCR del gen M del paramixovirus 1 amplificando un producto de 120 pb (Figura 7).

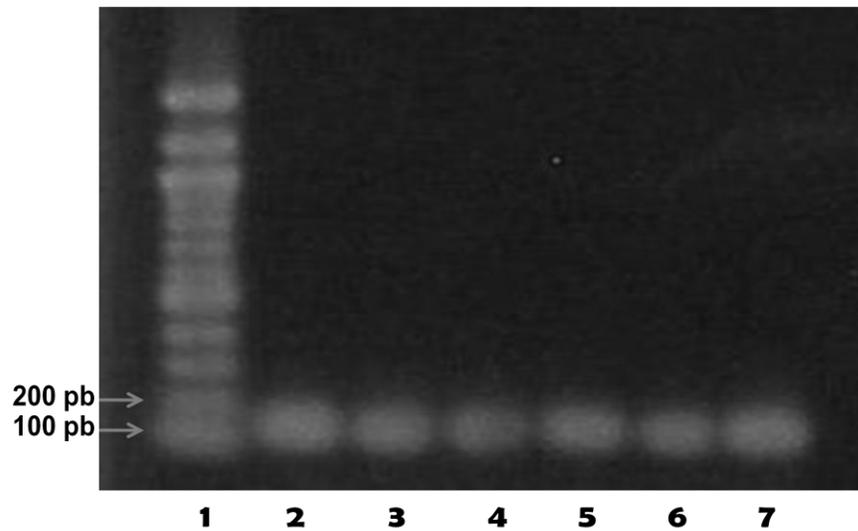


Figura 7. Productos de RT-PCR para diagnóstico del paramixovirus 1. En esta reacción se amplificaron 120 pb del gen M del paramixovirus 1. Carril 1 marcador de ADN de 100 pb (Roche); carril 2 ARN de virus de Newcastle vacunal cepa La sota como testigo positivo; carriles 3-5 muestras cloacales del 6-I-2008 de los grupos 1, 3, 4; y carriles 6 y 7 muestras de agua de enero y febrero respectivamente. Todas estas muestras fueron positivas.

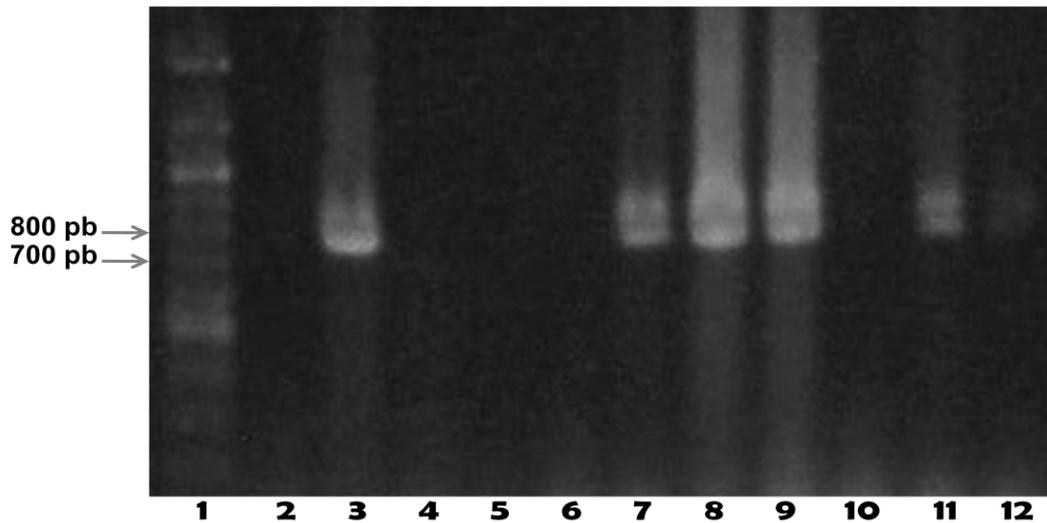


Figura 8. Productos de RT-PCR de diagnóstico del influenzavirus A. Se amplificaron 761 pb del gen M del virus de influenza. Carril 1 marcador de ADN de 100 pb (Roche); carril 2 ARN de líquido alantoideo como control negativo; carril 3 virus de influenza aviar H5N2/2007 proporcionado por CPA; carril 4 virus de Newcastle vacunal cepa La sota; carril 5 agua DEPC; carriles 6 y 7 muestras traqueal y cloacal del grupo 1 del 4-XI-2007; carriles 8 y 9 muestras traqueal y cloacal del grupo 2 del 4-XI-2007; carril 10 y 11 muestras traqueal del grupo 3 y cloacal del grupo 4 del 4-XI-2007; carril 12 muestra cloacal del grupo 2 del 11-XI-2007. Solo las muestras 1C, 2T, 2C y 4C del 4-XI-2007 y la muestra 2C del 11-XI-2007 fueron positivas.

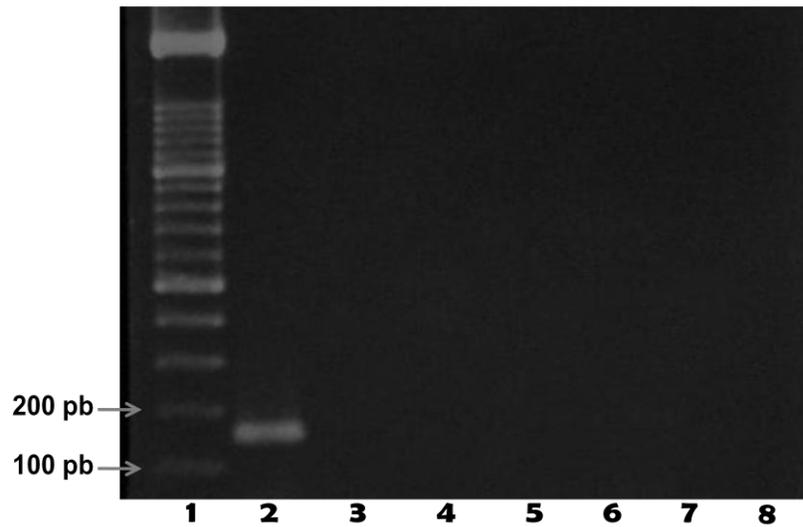


Figura 9. Productos de RT-PCR para diagnóstico del subtipo H5 del gen HA del influenzavirus A. Se amplificaron 161 pb. Carril 1 marcador de ADN de 100 pb (Roche); carril 2 ARN del virus de influenza aviar H5N2/2007 proporcionado por CPA como testigo positivo; carril 3 liquido alantoideo como testigo negativo; carril 4 muestra cloacal del grupo 1 del 4-XI-2007; carriles 5 y 6 muestras traqueal y cloacal del grupo 2 del 4-XI-2007; carril 7 muestra cloacal del grupo 4 del 4-XI-2007; carril 8 muestra cloacal del grupo 2 del 11-XI-2007. Sólo el virus control H5N2 amplificó el producto esperado.

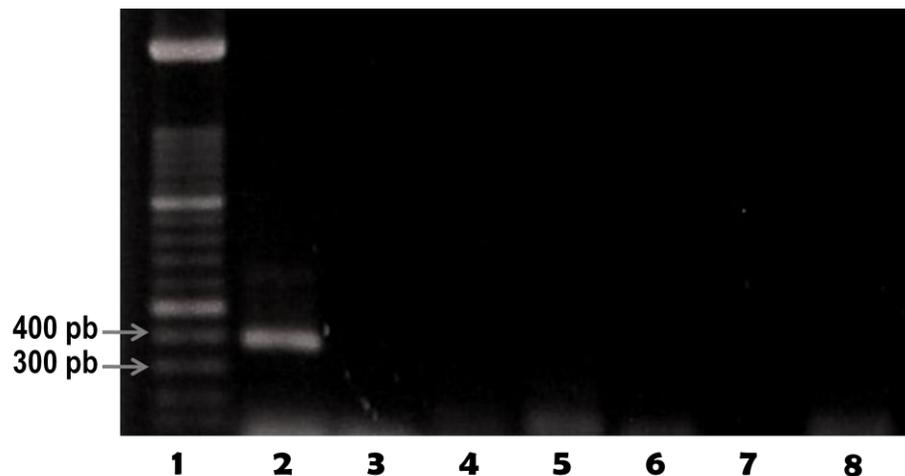


Figura 10. Productos de RT-PCR de diagnóstico del subtipo H7 del gen HA del influenzavirus A. El tamaño del producto esperado fue de 390 pb. Carril 1 marcador de ADN de 100 pb (Roche); carril 2 ARN del virus de influenza aviar H7N3/cerceta azul como control positivo; carril 3 liquido alantoideo como testigo negativo; carril 4 muestra cloacal del grupo 1 del 4-XI-2007; carriles 5 y 6 muestras traqueal y cloacal del grupo 2 del 4-XI-2007; carril 7 muestra cloacal del grupo 4 del 4-XI-2007; carril 8 muestra cloacal del grupo 2 del 11-XI-2007. Sólo el virus control H7N3 amplificó el producto esperado.

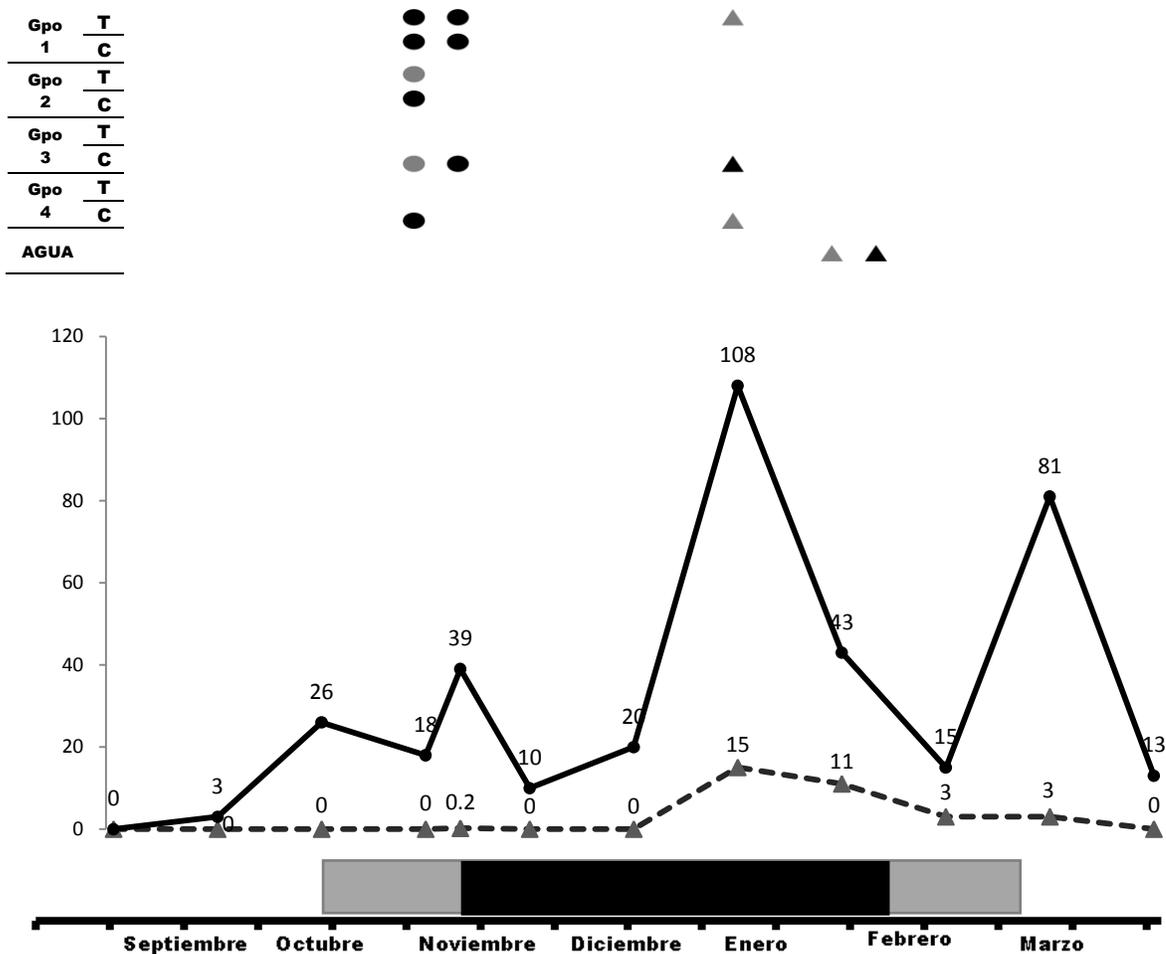


Figura 11. Comparación de resultados de los aislamientos, títulos serológicos y densidades de aves en el bordo. En el esquema se muestra en el eje principal (parte inferior) el periodo de estancia de las aves migratorias [■], marcando el periodo de mediados de noviembre, diciembre, enero y principios de febrero como los meses de mayor riqueza de especies aviarias en el bordo [■]. Tomando como referencia el eje principal, en la parte superior se esquematizan los aislamientos positivos a *influenzavirus A* [●] y *paramixovirus 1* [▲] así como los virus aislados al pase [● y ▲ respectivamente] a partir de hisopos traqueales y cloacales de los patos centinelas en los meses de noviembre y enero así como los aislamientos a partir de agua en los meses de enero y febrero. En la parte media se muestra la gráfica de la media geométrica de los títulos serológicos contra *influenzavirus A* [—●—] y *paramixovirus 1* [—▲—] presentes en los patos centinelas a lo largo del periodo de estudio.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

AISLAMIENTOS VIRALES

El influenzavirus A y el paramixovirus 1 estuvieron presentes en el humedal de estudio siendo aislados en embrión de pollo tanto de muestras de patos centinelas como de agua.

Los aislamientos virales fueron realizados en la época de estancia de las aves migratorias en el bordo, cuando las condiciones de clima con temperaturas bajas y la elevada densidad de aves en el humedal favorecen la presencia y replicación de los agentes (Figura 8).

Lo anterior obedece a las teorías establecidas en estudios previos (Brown *et al.*, 2008), en los que se ha observado que las bajas temperaturas favorecen la preservación y viabilidad del influenzavirus A y el paramixovirus 1, y cuando encontramos en el ambiente un gran número de hospederos en los que estos agentes pueden replicarse y eliminarse en grandes cantidades para continuar el ciclo, el virus pudo ser detectado tanto en agua como en patos (Stalknecht *et al.*, 1990; Hubalek 2004; Brown *et al.*, 2007).

El primer aislamiento fue de influenzavirus A al comienzo del mes de noviembre, cuando comenzó la temporada de alta densidad de aves en el bordo. Esto nos indica que el virus infectó a nuestras aves sólo hasta que hubo una cantidad suficiente de hospedadores que replicaron al virus eliminándolo en cantidad suficiente para llegar a infectar a los patos centinelas.

El segundo aislamiento realizado, se efectuó a los siete días del primero. En este se detectó al influenzavirus A, comprobando que la infección persistía en los patos que eliminaban el virus vía cloaca. El virus continuó eliminándose 7 días posteriores al primer aislamiento, mostrando un periodo de eliminación más prolongado al reportado por Stalknecht (2007) al infectar patos de siete especies distintas con el virus H5N1/Hong Kong de alta patogenicidad, presentando un periodo de excreción de tres a cinco días. Hay que tomar en cuenta que la excreción viral pudo durar más de siete días en nuestros patos centinelas, ya que pudo haber comenzado días antes de realizar el muestreo del primer aislamiento, y pudo terminar días después del muestreo a los siete días. Pero esto no pudo

ser comprobado al no realizar muestreos más continuos en este periodo. Una razón por la cual el periodo de excreción en nuestros centinelas fue más prolongado al reportado por Stalknecht (2007), es porque el influenzavirus A aislado en este estudio es un virus silvestre, adaptado a los patos, que puede infectar, replicarse y eliminarse en grandes cantidades, sin causar consecuencias graves ni signos clínicos en sus huéspedes, permitiendo un periodo de excreción más prolongado.

El influenzavirus A no volvió a ser aislado a partir de muestras de los centinelas muy probablemente debido a la respuesta inmune de los patos, la cual se trata más adelante.

El paramixovirus 1 se aisló tanto en patos como en agua. El primer aislamiento del paramixovirus 1 se realizó a principios del mes de enero del 2008 a partir de las muestras de hisopos cloacales de los patos centinelas. En esta época se registraron las densidades más altas de aves en el cuerpo de agua coincidiendo con los registros de Vázquez-Rivera (2007), con lo cual la diseminación del virus fue facilitada entre las aves que convivían en estrecho contacto (Hubaleck 2004). Al igual que para el caso del influenzavirus A, el paramixovirus 1 se encuentra en humedales habitados por un gran número de aves durante la época de invierno, con la diferencia de que este agente pudo ser aislado solo hasta que la densidad de aves en el bordo estuvo en su máximo. Lo anterior nos da evidencia de que el paramixovirus 1 podría estar menos adaptado a este tipo de aves, al tener menos individuos susceptibles a este agente o replicarlo en menor cantidad el virus tarda más tiempo en hacerse evidente en los aislamientos, coincidiendo con los resultados encontrados en otros estudios, en los cuales el índice de aislamientos del paramixovirus 1 es menor al del influenzavirus A debido a que mencionan que muchas especies de anseriformes son resistentes al paramixovirus 1 (Wan *et al.*, 2004; Hua *et al.*, 2005; Douglas *et al.*, 2007; Lindh *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2008).

Los últimos dos aislamientos realizados fueron de Paramixovirus 1 a partir de agua en los muestreos de finales de enero y principios de febrero. Estos aislamientos fueron hechos a partir de las muestras de agua del claro central, donde se congregaban y convivían la mayor cantidad de aves en el bordo. Basados en estos resultados, podemos concluir que el

paramixovirus 1 pudo ser detectado al aislamiento solo hasta la época de mayor densidad en el humedal, al tener una gran cantidad de aves que infectar, replicándose en ellos para ser eliminado al ambiente en cantidades importantes y ser aislado a partir de muestras de agua. El virus podía ser preservado en el ambiente gracias a las temperaturas bajas de invierno.

Los aislamientos realizados dan evidencia de que los mixovirus aviáres, como el influenzavirus A y el paramixovirus 1, están presentes en humedales del Estado de México, lo cual sustenta la idea de que en otros cuerpos de agua con alta densidad de especies de patos en el país los virus pueden estar presentes y mantenerse viables.

Con este estudio se demostró que tanto el influenzavirus A como el paramixovirus 1 están presentes en humedales mexicanos, pero faltan por esclarecer varias incógnitas. No está determinado cuantos subtipos de virus se encuentran, si se mantienen en el ambiente o son transportados por las aves migratorias cada año, pudiendo variar los subtipos aislados. Desconocemos a que especies infectan, y si las especies endémicas, como el *A. diazi* es hospedero de estos virus. Es importante ahondar en la ecología de estos virus en ambientes del país.

Con el aislamiento viral en embrión de pollo se comprobó que los virus encontrados estaban activos. Al no presentar mortalidad embrionaria dentro de las primeras 72 horas, se comprobó que se trataba de influenzavirus A de baja patogenicidad y paramixovirus 1 lentogénicos.

Cabe mencionar que los pobladores de la región poseen especies de aves domésticas de traspatio en hogares aledaños al humedal además de cerdos u otras especies. Por este motivo es recomendable realizar monitoreos de la zona y estudios filogenéticos del virus para poder implementar medidas de prevención y control de cualquier riesgo o probable brote.

TÍTULOS DE ANTICUERPOS DE PATOS

Títulos contra influenzavirus A. Los títulos de anticuerpos en los patos estuvieron presentes desde el primer muestreo, evidenciando la presencia de forma indirecta del influenzavirus A y el paramixovirus 1. Los anticuerpos contra el influenzavirus A se presentaron en cinco patos para el primer muestreo, pero solo tres con títulos significativos mayores a 1:10. Es hasta octubre cuando todos los individuos mostraron títulos contra el influenzavirus A. Esto nos da evidencia indirecta de la presencia del agente desde esta época. Los títulos se mantuvieron constantes hasta el mes de noviembre cuando mostraron el primer incremento. Este aumento se debe a que los patos fueron expuestos al influenzavirus A y desarrollaron la infección, elevando sus títulos de anticuerpos ante una respuesta inmune. Posteriormente los niveles de anticuerpos disminuyeron.

A principios del mes de enero los títulos serológicos contra influenzavirus A presentaron el máximo nivel registrado. El incremento en los anticuerpos contra influenzavirus A nos indica que el virus permanecía presente, y los patos volvieron a entrar en contacto con el agente montando una respuesta inmune más elevada para controlar la infección y al aislamiento el virus no fue detectado. Finalmente en el mes de marzo se presentó el último pico de anticuerpos que observamos, mostrando evidencia de una re-exposición de los patos centinelas al influenzavirus A.

Como era de esperarse, los patos montaron una respuesta inmune contra el agente al infectarse por primera vez. Pero en las siguientes exposiciones al virus, la infección fue controlada por el sistema inmune de los patos, reflejándose en el aumento de los títulos de anticuerpos contra el virus. Este fenómeno sucede en aves al vacunarlas. Al entrar en contacto en ocasiones posteriores con el agente, la respuesta inmunológica será más elevada para proteger al huésped, y al ser controlado el virus por el sistema inmune del animal el virus no es eliminado. De esta manera si el animal es muestreado el agente no será aislado (Philippa *et al.*, 2007; Bertelsen *et al.*, 2007; Furger *et al.*, 2008).

Lo anterior sucedió en la época de mayor densidad de aves en el humedal, cuando el virus podía ser más fácilmente diseminado entre individuos que convivían en estrecho contacto facilitando la circulación del virus (Figura 8).

Los títulos de anticuerpos contra influenzavirus A encontrados en los patos centinelas nos dan evidencia indirecta de la presencia del agente. En la primera exposición de los patos al virus, los centinelas desarrollaron la infección y montaron una respuesta. Y podemos concluir que el virus de influenza recirculaba y volvió a estar en contacto con nuestros patos como lo muestran los títulos serológicos del mes de enero y febrero, cuando encontramos patos con valores elevados. Esto nos da evidencia de que el virus recircula en el ambiente y los patos durante la época de gran abundancia de individuos con la estancia de las aves migratorias.

Títulos contra Paramixovirus 1. Los títulos séricos contra paramixovirus 1 mostraron incrementos al principio del mes de enero. Estos valores concuerdan con el aislamiento del para a partir de muestras de cloaca de los patos centinelas. Al presentar la infección con el PMVA1 los patos montaron respuesta inmune, explicando el incremento en los valores de anticuerpos contra este agente. Cabe mencionar que solo cinco ejemplares del grupo de ocho presentaron títulos de anticuerpos positivos mayores a 1:10. Esto pudo deberse a que los patos con títulos de anticuerpos menores a 1:10 se encontraban en un estadio de infección temprano sin haber montado aún una respuesta inmune contra el agente.

Los resultados reflejados en los títulos serológicos de nuestro estudio refuerzan los supuestos de que el influenzavirus A y el paramixovirus 1 pueden estar presentes en ambientes con altas poblaciones de aves y condiciones propicias. Podemos observar que en la época con alta población de aves, la circulación de los virus se facilita, reflejándose en el aumento de los títulos de anticuerpos (Figura 8).

Este es el primer estudio que evalúa la respuesta inmune de aves en una ambiente silvestre ante la exposición del influenzavirus A y el paramixovirus 1 en condiciones

naturales. Pero es necesario realizar más estudios con aves silvestres en este tipo de ambientes.

RESULTADOS DE DX POR RT-PCR

Los aislamientos en embrión de pollo positivos a la hemoaglutinación fueron sometidos a RT-PCR para determinar si el virus en cuestión era paramixovirus 1 o influenzavirus A. Cabe mencionar que fue por este método de diagnóstico por el cual se pudo evidenciar la presencia del paramixovirus 1, ya que todas las muestras positivas a hemoaglutinación con glóbulos rojos de pollo mostraron inhibición de la hemoaglutinación con suero hiperinmune contra el influenzavirus A. Pero al correr la RT-PCR para identificar el gen M del paramixovirus, las muestras de patos positivas a HA del mes de enero y los aislamientos en agua fueron positivas a la reacción amplificando el segmento de 120 pb del genoma del paramixovirus 1.

Las muestras positivas a la RT-PCR del gen M del influenzavirus A fueron sometidas a una segunda reacción para amplificar el subtipo H5 y el H7, pero los resultados fueron negativos. Solo se corrieron estas dos reacciones debido a razones específicas. La primera fue que los aislamientos se realizaron en embrión de pollo, siendo muy probable que el virus en cuestión perteneciera a un subtipo de hemoaglutinina H5 o H7 que infectan más comúnmente a esta especie. La segunda es que en México el subtipo encontrado es un H5, por lo que sería lógico encontrar un virus perteneciente a este subtipo; y por último, los dos únicos virus disponibles para estandarizar las RT-PCR fueron un H5N2 nacional y un H7N3 aislado en el 2006 a partir de una cerceta canela durante la temporada de migración en las ciénagas del Lerma. No se estandarizaron más RT-PCR para diagnóstico y secuenciación de los demás subtipos de influenzavirus A debido a la carencia de material genético o cepas de las cuales extraerlo.

Los resultados de RT-PCR negativos a la amplificación del gene HA para los subtipos 5 y 7 del virus de influenza aviar indican un subtipo diferente de hemoaglutinina. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, su tipificación no fue posible debido a la carencia y

dificultad para obtener cepas de influenzavirus con HA diferentes a la nacional, dado el riesgo biológico que implica la introducción y manejo de estos biológicos. Además de las medidas y legislaciones en materia de sanidad.

Es importante contar con la RT-PCR como método de diagnóstico para evidenciar la presencia de agentes patógenos como el influenzavirus y el paramixovirus en este tipo de estudios (Heine *et al.*, 2007; Suarez *et al.*, 2007). Cabe mencionar que en este estudio se empleo en conjunto con el aislamiento viral para demostrar que los virus estaban activos, y posteriormente se utilizó la RT-PCR como método eficiente de diagnóstico e identificación de los virus.

Los resultados de RT-PCR obtenidos nos muestran que el subtipo aislado no pertenece a las hemoaglutininas H5 y H7, lo cual desmiente la idea de que en México solo existe el subtipo H5N2 del virus de influenza aviar. Por mucho tiempo se sostuvo que en México el único subtipo de influenzavirus existente era el H5N2, al vigilar solo aves domésticas. Pero al cambiar de objetivo, hacia las aves silvestres y sabiendo que en Norteamérica estas portan 15 de las 16 HAs y las 9 NAs, comprobamos que en nuestro país en ambientes naturales existen otros subtipos del influenzavirus A.

Es necesario mencionar que no se pudo determinar el subtipo de influenzavirus A y por lo tanto no fue posible caracterizarlo y comparar las secuencias para concluir si el o los virus en cuestión son parecidos a los norteamericanos o son nuevos. Por este motivo se seguirá trabajando al respecto en la caracterización molecular utilizando iniciadores específicos o degenerados para todas las Hs ó bien clonación y secuenciación.

Hace falta realizar más investigaciones en ambientes silvestres para determinar si las especies de Anseriformes residentes son hospederos de estos virus, y que subtipos encontramos en ellas.

Es necesario realizar monitoreos de forma constante en aves y ambientes silvestres para determinar qué tipo de virus habitan en ellos. Es importante determinar si estos virus se mantienen en nuestros humedales o son transportados por las aves migratorias, si son

subtipos diferentes o similares a los encontrados en Norteamérica. Si las especies endémicas son huéspedes para estos agentes. Es preciso profundizar en estos estudios y tener un registro de los subtipos que tenemos en nuestro territorio, para determinar su origen, identificar mutaciones y recombinación genética y, con el intercambio intercontinental de virus reportado en Alaska por aves migratorias (Koehler 2008), poder implementar las medidas necesarias para evitar riesgos de brotes o epidemias en la avicultura, aves silvestres y salud pública.

Con este estudio se comprobó que en un humedal cercano al trópico el influenzavirus A y el paramixovirus 1 están presentes. Esto nos da pauta para sustentar que en humedales de latitudes cercanas al trópico estos virus están presentes, pero hay que realizar más estudios al respecto.

REFERENCIAS

1. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fundamental Virology* fourth edition. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
2. Saif YM, Barnes HJ, Glison JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. *Diseases of poultry*. 11th Ed. Iowa:Blackwell Publishing, 2003.
3. Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR. *Avian Medicine: principles and application*. Florida:Wingers Publishing, 1994.
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (Virus data Bases). ICTVdB está mantenido por NIH/NIAID (PI Lipkin, Columbia University); 2008. Disponible en: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>
5. Jonassen MC, Handeland K. Avian InfluenzaVirus Screening in Wild Waterfowl in Norway, 2005. *Avian Dis* 2007 50 (suppl): 425-428.
6. Pasick J, Handel K, Robinson J, Bowes V, Li Y, Leighton T, Kehler H, Ridd D, Cottam-Birt C. Relationship Between H5N2 Avian Influenza Viruses Isolated from Wild and Domestic Ducks in British Colombia, Canada. *Avian Dis* 2007 50 (suppl): 429-431.
7. Dalessi S, Hoop R, Engels M. The 2005/2006 Avian Influenza Monitoring of Wild Birds an Commercial Poultry in Switzerland. *Avian Dis* 2007 50 (suppl): 355-358.
8. Cuevas-Dominguez EA. Detección de orthomyxovirus y paramyxovirus en anátidos de la Laguna de Chiconahuapan, Estado de México (tesis de maestría). México (Distrito Federal) México: UNAM, 2007.
9. Wan H, Chen L, Wu L, Liu X. Newcastle disease in geese: natural occurrence and experimental infection. *Avian Pathol* 2004 Abril 32 (2): 216-221.
10. Glaser LC, Barker IK, Weseloh DV, Ludwig J, Windingstad RM, Key DW, Bollinger TK. The 1992 epizootic of Newcastle disease in double-crested cormorants in North America. *J Wildl Dis* 1999 35 (2): 319-330.
11. Brown JD, Swayne DE, Cooper RJ, Burns RE, Stallknecht DE. Persistence of H5 and H7 Avian Influenza viruses in water. *Avian Dis* 2007 50 (suppl): 285-289.
12. Hanson BA, Stallknecht DE, Swayne DE, Lewis LA, Senne DA. Avian Influenza Viruses in Minnesota Ducks during 1998-2000. *Avian Dis* 2003 47: 867-871.

13. Stalknecht DE, Shane SM, Zwank PJ, Senne DA, Kearney MT. Avian Influenza Viruses from migratory and resident ducks of Coastal Louisiana. *Avian Dis* 1990 34: 398-405.
14. Brown JD, Stallknecht DE, Beck JR, Suarez DL, Swayne DE. Susceptibility of North American Ducks and Gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Emerg Infect Dis* 2006 12 (11): 1663-1670.
15. Pantin-Jackwood MJ, Swayne DE. Pathobiology of asian highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection in ducks. *Avian Dis* 2007 51:250-259.
16. De Marco MA, Foni GE, Campitelli L, Raffini E, Di Trani L, Delogu M, Guberti V, Barigazzi G, 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 Dis* 2003 47: 861-866.
17. Fourchier RA, Olsen B, Bestebroer TM, Herfst S, van der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Influenza A virus Surveillance in Wild Birds in Northern Europe in 1999 and 2000. *Avian Dis* 2003 47 suppl: 857-860.
18. Fereidouni SR, Aghakhan M, Werner O, Starick E, Bozorghmehrifard MH.. Isolation and Identification of Avian Influenza Viruses from Migratory Birds in Iran. *Vet Rec* 2005 october: 526
19. Liu J, Xiao H, Lei F, Zhu Q, Qin K, Zhang XW, Zhang XL, Zhao D, Wang G, Feng Y, Ma J, Liu W, Wang J, Gao GF. Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Infection in Migratory Birds. *Science* 2005 agosto. Vol. 309: 1206.
20. Normile D. Evidence Points to Migratory Birds in H5N1 Spread. *Science* 2006 marzo, vol 311: 1225.
21. Feare C.J. The Role of Wild Birds in the Spread of HPAI H5N1. *Avian Dis* 2007, 50 (suppl): 440-447.
22. Slemons RD, Hansen WR, Converse KA, Senne DA. Type A Influenza Virus Surveillance in Free-Flying, Nonmigratory Ducks Residing on the Eastern Shore of Maryland. *Avian Dis* 2003 47 (suppl): 1107-1110.
23. Hubalek Z. An Annotated Checklist of Pathogenic Microorganisms Associated with Migratory Birds. *J Wildl Dis* 2004 40 (4): 639-659.
24. Vázquez-Rivera H. Preferencia de Hábitat por la Avifauna presente en la Laguna Chimaliapan, Ciénegas de Lerma, Lerma, Estado de México (tesis de maestría). México, (Distrito Federal) México: UNAM, 2004.

25. Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar. Diario Oficial de la Nación 14-agosto-1996.
26. Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle presentación velogénica. Diario Oficial de la Nación 28-febrero-1995.
27. Philippa J, Baas C, Beyer W, Bestebroer T, Fouchier R, Smith D, Schaftenaar W, Osterhaus A. Vaccination against highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in zoos using an adjuvanted inactivated H5N2 vaccine. *Vaccine*. 2007 25: 3800-3808.
28. Bertelsen MF, Klausen J, Holm E, Grøndahl C, Jørgensen PH. Serological response to vaccination against avian influenza in zoo-birds using an inactivated H5N9 vaccine. *Vaccine* 2007 25: 4345-4449.
29. Furger M, Hoop R, Steinmetz H, Eulenberger U, Hatt JM. Humoral immune response to avian influenza vaccination over a six-month period in different species of captive wild birds. *Avian Dis* 2008 52: 222-228.
30. Heine HG, Trinidad L, Selleck P, Lowther S. Rapid detection in highly pathogenic avian influenza H5N1 virus by taqman reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Dis* 2007 50: 370-372.
31. Suarez DL, Das A, Ellis E. Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis* 2007 50: 201-208.
32. Koehler AV, Pearce JM, Flint PL, Franson JC, Ip HS. Genetic evidence of intercontinental movement of avian influenza in a migratory bird: the northern pintail (*Anas acuta*). *Mol Ecol* 2008 17 (21): 4754–4762.
33. Spackman E, Stallknecht DE, Slemons RD, Winker K, Suarez DL, Scott M, Swayne DE. Phylogenetic analyses of type A influenza genes in natural reservoir species in North America reveals genetic variation. *Virus Res* 2005 114: 89–100.
34. Cattoli G, Terregino C, Guberti V, De Nardi R, Drago A, Salviato A, Fassina S, Capua I. Influenza Virus Surveillance in Wild Birds in Italy: Results of Laboratory Investigations in 2003-2005. *Avian Dis* 2007 50 (suppl): 414-416.
35. Perkins LE, Swayne DE. Varied Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars. *Vet Pathol* 2003 40: 14-24.
36. Alexander DJ. Summary of Avian Influenza Activity in Europe, Asia, Africa and Australia, 2002-2006. *Avian Dis* 2007 50 (suppl): 161-167.

37. Senne DA. Avian Influenza in North and South America, 2002-2005. *Avian Dis* 2007 50 (suppl): 167-173.
38. Alexander DJ. Report of Avian Influenza in the Eastern Hemisphere During 2002-2006. *Avian Dis* 2003 47 (suppl): 792-797.
39. Senne DA. Avian Influenza in the Western Hemisphere including the Pacific Islands and Australia. *Avian Dis* 2003 47 suppl.: 798-805.
40. Van Borm S, Steensels M, Ferreira HL, Boschmans M, De Vriese J, Lambrecht B, van den Berg T. A Universal Avian Endogenous Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Control and its Application to Avian Diagnosis and Quantification. *Avian Dis* 2007 50: 213-220.
41. Schnebel B, Dierschke V, Rautenschlein S, Ryll M, Neumann U. Investigation on infection status with H5 and H7 Avian Influenza Virus in short-distance and long-distance migrant birds in 2001. *Avian Dis* 2007 50: 432-433.
42. Van der Goot JA, van Boven M, de Jong MC, Koch G. Effect of vaccination on transmission of HPAI H5N1: the effect of a single vaccination dose in transmission of highly pathogenic avian influenza H5N1 in peking ducks. *Avian Dis* 2007 50:323-324.
43. Steensels M, Van Borm S, Lambrecht B, De Vriese J, Le Gros FX, Bublot M, van den Berg T. Efficacy of an inactivated and a fowlpox-vectored vaccine in Muscovy ducks against an Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viral challenge. *Avian Dis* 2007 50: 325-331.
44. Obon E, Bailey TA, O'Donovan D, McKeown S, Kent J, Joseph S, Wernery U. Humoral response to H5N2 vaccination in exotic birds in the United Arab Emirates, Communication. *Vet Rec* 2007 16:860-861.
45. Oh S, Martelli P, Oh SH, Luz S, Furley C, Chiek EJ, Wee LC, Keun NM. Field study in the use of inactivated H5N2 vaccine in avian species. *Vet Rec* 2005 sep: 299-300.
46. Tiensin T, Nielen M, Songserm T, Kalpravidh W, Chaitaweesub P, Amonsin A, Chotiprasatintara S, Chaisingh A, Damrongwatanapokin S, Wongkasemjit S, Antarasena C, Songkitti V, Chanachai K, Thanapongtham W, Stegeman JA. Geographic and temporal distribution of highly pathogenic avian influenza A virus (H5N1) in Thailand, 2004-2005: an overview. *Avian Dis* 2007 50: 182-188.
47. Alexander J.D. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa and Australia, 2002-2006. *Avian Dis* 2007. 50: 161-166.

48. Slomka MJ, Coward VJ, Banks J, Löndt BZ, Brown IH, Voermans J, Koch G, Handberg KJ, Jørgensen PH, Cherbonnel-Pansart M, Jestin V, Cattoli G, Capua I, Ejdersund A, Thorén P, Czifra G. Identification of sensitive and specific avian influenza polymerase chain reaction methods through blind ring trials organized in the European union. *Avian Dis* 2007 50: 227-234.
49. Rossi J, Cramer S, Laue T. Sensitive and specific detection of influenza virus A subtype H5 with real time PCR. *Avian Dis* 2007 50: 387-389.
50. Yacoub A, Kiss I, Zohari S, Hakhverdyan M, Czifra G, Mohamed N, Gyarmati P, Blomberg J, Belák S. The rapid molecular subtyping and pathotyping of avian influenza viruses. *J Virol Methods*. 2009 156(1-2):157-61.
51. Wise MG, Suarez DL, Seal BS, Pedersen JC, Senne DA, King DJ, Kapczynski DR, Spackman E. Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 2004 42(1):329-38.
52. Nusser SH, Clark WR, Otis DL, Huang L. Sampling Considerations for Disease Surveillance in Wildlife Populations. *The Journal of Wildlife Management*. 2008. 72(1):52–60.
53. Karlsson M, Wallensten A, Lundkvist A, Olsen B, Brytting M. A real-time PCR assay for the monitoring of influenza A virus in wild birds. *J Virol Methods* 2007 144: 27–31.
54. Ward MP, Maftai DN, Apostu CL, Suru AR. Association Between Outbreaks of Highly Pathogenic Avian Influenza Subtype H5N1 and Migratory Waterfowl (Family Anatidae) Populations. *Zoonoses Public Health* 2009 56(1):1-9.
55. Brown JD, Goekjian G, Poulson R, Valeika S, Stallknecht DE. Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperatura. 2008 Epub. *Vet Microbiol* 2009 14;136(1-2):20-6.
56. Cattoli G, Terregino C. New Perspectives in Avian Influenza Diagnosis. *Zoonoses Public Health* 2008 55(1):24-8.
57. Latorre-Margalef N, Gunnarsson G, Munster VJ, Fouchier RA, Osterhaus AD, Elmberg J, Olsen B, Wallensten A, Haemig PD, Fransson T, Brudin L, Waldenström J. Effects of influenza A virus infection on migrating mallard ducks. *Proc Biol Sci* 2009 Mar 22;276(1659):1029-36.
58. Kapan DD, Bennett SN, Ellis B, Fox J, Lewis ND, Spencer JH, Saksena S, Wilcox BA. Avian Influenza (H5N1) and the Evolutionary and Social Ecology of Infectious Disease Emergence. *EcoHealth* 2006 3: 187–194.

59. Mukhtar MM, Rasool ST, Song D, Zhu C, Hao Q, Zhu Y, Wu J. Origin of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in China and genetic characterization of donor and recipient viruses. *J Gen Virol* 2007 88: 3094-3099.
60. Lindh E, Huovilainen A, Rätti O, Ek-Kommonen C, Sironen T, Huhtamo E, Pöysä H, Vaheri A, Vapalahti O. Orthomyxo-, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland. *Virol J* 2008 28;5:35.
61. Hua YP, Chai HL, Yang SY, Zeng XW, Sun Y. Primary survey of avian influenza virus and Newcastle disease virus infection in wild birds in some areas of Heilongjiang Province, China. *J Vet Sci* 2005 6 (4): 311-315.
62. Douglas KO, Lavoie LC, Kim LM, Afonso CL, Suarez DL. Isolation and genetic characterization of avian influenza viruses and a Newcastle disease virus form wild birds in Barbados: 2003–2004. *Avian Dis* 2007 51(3):781-7.
63. Zeng X, Hua Y, Li X, Zhang Z. Monitoring influenza A virus and Newcastle disease virus in migratory waterfowls in Sanjiang natural reserve of Heilongjiang Province. *Acta microbiológica sínica (Wei Sheng Wu Xue Bao)* 2008 4;48(10):1403-1407.
64. Winker K, McCracken KG, Gibson DD, Pruett CL, Meier R, Huettmann F, Wege M, Kulikova IV, Zhuravlev YN, Perdue ML, Spackman E, Suarez DL, Swayne DE. Movements of birds and avian influenza from Asia into Alaska. *Emerg Infect Dis* 2007 13(4):547-552.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores empleados en el estudio.	17
Cuadro 2. Resultados de aislamiento y pase viral en embrión de pollo a partir de las muestras obtenidas de los grupos de patos y agua.	21
Cuadro 3. Títulos serológicos contra Influenzavirus A y paramixovirus 1 de los patos centinelas a lo largo del periodo de estudio.	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica del área de estudio.	10
Figura 2. Diseño muestral y actividades realizadas en el humedal durante el periodo de estudio. 13	
Figura 3. Área de estudio mostrando la riqueza de especies aviares existentes durante el mes de diciembre 2007	19
Figura 4. Patos centinelas en estrecho contacto con las aves silvestres en el bordo “Las Maravillas”.	20
Figura 5. Títulos serológicos de los patos centinelas contra el virus de influenza.	24
Figura 6. Títulos serológicos de los patos centinelas contra el paramixovirus 1.	25
Figura 7. Productos de RT-PCR para diagnóstico del paramixovirus 1.	27
Figura 8. Productos de RT-PCR de diagnóstico del influenzavirus A.	27
Figura 9. Productos de RT-PCR para diagnóstico del subtipo H5 del gen HA del influenzavirus A.	28
Figura 10. Productos de RT-PCR de diagnóstico del subtipo H7 del gen HA del influenzavirus A.	28
Figura 11. Comparación de resultados de los aislamientos, títulos serológicos y densidades de aves en el bordo.	29