



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“DETECCIÓN POR PCR DEL *Anatid alphaherpesvirus 1* EN PATOS  
MIGRATORIOS”**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA**

**MAYRA ITZEL ARAUJO MAYORGA**

**TUTOR**

**Dr. GARY GARCÍA ESPINOSA (FMVZ- UNAM)**

**COMITÉ TUTORAL**

**Dra. ELIZABETH LOZA RUBIO (CENID-INIFAP)**

**MC. FERNANDO GUAL SILL (UAM- XOCHIMILCO)**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**FEBRERO, 2020**



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

*A mi madre, por ser un ejemplo a seguir y por su apoyo incondicional durante mi vida.*

*A mis hermanos Memo y Sandra, por su apoyo y becas otorgadas.*

*A mi padre, por demostrarme que la vida siempre puede ser más difícil, más no imposible por más adversidades que se crucen en el camino.*

*A mi abuela Rosa María, por soportar todas mis travesuras.*

*A Jessica y Pablo, que no se apartaron de mi lado en momentos lúgubres que me acompañaron durante toda la maestría.*

*A Pulga, Mamushka, Morgana, Moka, Buster, Amonet, Simon Birch, Isis, Anubis, Roberto y Darwin que han sido mis compañeros de desvelos, triunfos, alegrías, tristezas, derrotas, victorias y el impulso para seguir aprendiendo más cada día.*

*A mi familia, amigos y compañeros que directa o indirectamente me ayudaron durante la realización de mis estudios de maestría.*

***“Nunca podrás controlar las acciones de los demás, solamente como tú reaccionas ante ellas”***

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca que me fue otorgada para realizar mis estudios de maestría con el número de registro 893855.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma máter.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-IN218716).

Al Dr. Gary García, mi agradecimiento y admiración por su apoyo, confianza, disposición, consejos, entusiasmo y opiniones hacia este trabajo y principalmente por su infinita paciencia conmigo. Mi profundo respeto y admiración hacia su persona.

A mi comité tutorial, la Dra. Elizabeth Loza-Rubio y el Dr. Fernando Gual Sill por el apoyo y la dedicación brindados, sin los cuales este trabajo de tesis no hubiera podido realizarse.

A los miembros del jurado, por su disponibilidad y tiempo dedicado a la revisión de mi tesis.

Dr. José Juan Martínez Maya	Presidente
Dr. Gary García Espinosa	Secretario
Dr. Felix Domingo Sanchez Godoy	Vocal
Dr. Juan Carlos Del Río García	Vocal
Dr. Salvador Fonseca Coronado	Vocal

A la Dra. Edith Rojas del Centro Nacional de Microbiología Veterinaria del INIFAP.

A la Dra. Laura Ongay del Instituto de Fisiología Celular, Unidad de Biología Molecular, UNAM.

Al MC. Fernando Chávez Maya por la asesoría técnica en equipos y procedimientos de laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Oscar Torres y el Dr. Luis Ramírez.

A todos los profesores que me han guiado y motivado a seguir con mis estudios y desarrollo humano a pesar de las adversidades que se han presentado en mi camino.

## Resumen

Las enfermedades herpesvirales aviares más estudiadas son la enteritis viral de los patos, Laringotraqueítis y la enfermedad de Marek. En México la Laringotraqueítis y la enfermedad de Marek son enzoóticas. La enteritis viral de los patos es una enfermedad que pertenece al grupo 1 del listado de las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, por lo que se le considera exótica. Es causada por el *Anatid alphaherpesvirus 1*. Se puede observar daño vascular, coagulopatía intravascular diseminada, necrosis, erupciones en la superficie de la mucosa del tracto digestivo y lesiones degenerativas en órganos parenquimatosos y linfoides. El objetivo del estudio fue determinar la presencia del *Anatid alphaherpesvirus 1* en muestras de heces de patos migratorios de los géneros *Anas*, *Mareca*, *Oxyura* y *Spatula* de la época invernal 2016-2017, obtenidas en la laguna de Chiconahuapan de las Ciénegas de Lerma, Estado de México, que obtuvieron por secuenciación masiva un 85% de secuencias de nucleótidos de la familia Herpesviridae que afecta a las aves. Se estandarizó el testigo positivo del plásmido sintético que contiene el gen de la polimerasa del *Anatid alphaherpesvirus 1* que amplifica un segmento de 446 pb, debido a que los herpesvirus son específicos de huésped y éste es el único herpesvirus conocido que afecta a los anátidos. Se detectó por PCR punto final la presencia de materia genética del *Anatid alphaherpesvirus 1* en 3 muestras de patos migratorios (*Spatula clypeata*, *Mareca americana* y *Mareca strepera*), en la laguna de Chiconahuapan de las Ciénegas de Lerma, Estado de México.

Financiado por el PAPIIT IN218716

Palabras clave: Patos, herpesvirus, enteritis viral de los patos

## **Abstract**

The most studied avian herpesvirus diseases are duck viral enteritis, laryngotracheitis and Marek's disease. In Mexico, laryngotracheitis and Marek's disease are enzootic. Duck viral enteritis is a disease that belongs to group 1 of the terrestrial and aquatic animal's exotic and endemic diseases and pests' mandatory notification list of the Ministry of Agriculture and Rural Development, so it is considered exotic. It is caused by the Anatid alphaherpesvirus 1. Vascular damage, disseminated intravascular coagulopathy, necrosis, eruptions on the digestive tract mucosa and degenerative lesions in parenchymatous and lymphoid organs can be observed. The study objective was to determine the presence of Anatid alphaherpesvirus 1 in migratory ducks fecal samples (*Anas*, *Mareca*, *Oxyura* and *Spatula* genera), in the winter season of 2016-2017, obtained in the Cienegas of Lerma Chiconahuapan lagoon, State of Mexico, which obtained, by mass sequencing, 85% of Herpesviridae family nucleotide sequences that affect birds. The synthetic plasmid positive control containing the Anatid alphaherpesvirus 1 polymerase gene that amplifies a segment of 446 bp, was standardized, because herpesviruses are host-specific and this is the only known herpesvirus that affects ducks. Anatid alphaherpesvirus 1 genetic material was detected by endpoint PCR in 3 samples of migratory ducks (*Spatula clypeata*, *Mareca americana* and *Mareca strepera*), in the Cienegas of Lerma Chiconahuapan lagoon, State of Mexico.

Financed by PAPIIT IN218716

Keywords: ducks, herpesvirus, duck viral enteritis

## ÍNDICE

<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>I. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>1</b>
I. I. HERPESVIRUS.....	1
I. II. CLASIFICACIÓN .....	1
I. III. ENFERMEDADES HERPESVIRALES AVIARES .....	2
I. IV. PATOS SILVESTRES .....	2
I. V. ENTERITIS VIRAL DE LOS PATOS .....	3
<i>Agente causal</i> .....	3
<i>Epidemias en patos silvestres</i> .....	4
<i>Especies susceptibles</i> .....	4
<i>Distribución, trasmisión y rutas de exposición</i> .....	5
<i>Periodo de incubación, signos clínicos, lesiones macroscópicas e histológicas</i> .....	6
<i>Técnicas de diagnóstico</i> .....	7
<i>Prevención y control</i> .....	8
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	<b>10</b>
<b>IV. OBJETIVO</b> .....	<b>10</b>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
1. ZONA DE ESTUDIO Y SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	10
2. ESTANDARIZACIÓN DEL CONTROL INTERNO EN LAS MUESTRAS (HANSEN <i>ET AL</i> , 2000).....	11
3. ESTANDARIZACIÓN DEL TESTIGO POSITIVO DEL PLÁSMIDO SINTÉTICO QUE CONTIENE EL GEN DE LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA ENTERITIS DE LOS PATOS (PUC57 POLDEV). .....	12
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	<b>14</b>
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>16</b>

<i>SUSCEPTIBILIDAD AL AHV1 DE LAS ESPECIES EN EL ESTUDIO</i> .....	16
<i>ELIMINACIÓN DEL AHV1 EN AVES PORTADORAS</i> .....	16
<i>ESTADO DE LATENCIA DEL VIRUS EN LAS AVES INFECTADAS</i> .....	17
<i>ESTACIONALIDAD DE LA ENFERMEDAD</i> .....	19
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>20</b>
<b>IX. PROSPECCIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>22</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>29</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. AMPLIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DE APROXIMADAMENTE 190 PB CORRESPONDIENTES AL CONTROL INTERNO EXÓGENO .....	29
FIGURA 2. AMPLIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DÚPLEX DEL CONTROL INTERNO EXÓGENO Y PLÁSMIDO PUC57 POLDEV .....	30
FIGURA 3. MAPA DEL PLÁSMIDO PUC57 CON EL INSERTO DEL GEN DE LA POLIMERASA DEL ANATID ALPHAPERPEVIRUS 1.....	31
FIGURA 4. ESTANDARIZACIÓN DEL TESTIGO POSITIVO DEL PLÁSMIDO PUC57 POLDEV CORRESPONDIENTE AL GEN DE LA POLIMERASA DEL AHV1 .....	31
FIGURA 5. AMPLIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DEL CONTROL INTERNO EXÓGENO HETERÓLOGO DE APROXIMADAMENTE 190 PB EN LAS MUESTRAS POSITIVAS AL PUC57 POLDEV .....	32
FIGURA 6. AMPLIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DE APROXIMADAMENTE 446 PB DE LAS MUESTRAS POSITIVAS AL PUC57 POLDEV .....	32
FIGURA 7. AMPLIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DE APROXIMADAMENTE 956 PB DE LA REGIÓN MCS DEL PUC57 POLDEV.....	33

## LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. NÚMERO DE PATOS POR ESPECIE QUE FUERON ANALIZADOS DURANTE LOS MESES DE ENERO A FEBRERO DEL AÑO 2016 EN LA LAGUNA DE CHICONAHUAPAN DE LAS CIÉNEGAS DE LERMA, ESTADO DE MÉXICO .....	34
CUADRO 2. IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE PCR.....	34
CUADRO 3. CUANTIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO EN LAS MUESTRAS PILOTO (NANODROP 1000) .....	34
CUADRO 4. INICIADORES UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DEL GEN DE LA POLIMERASA DEL AHV1 .....	35
CUADRO 5. PROTOCOLO DE PCR PUNTO FINAL DE HANSEN <i>ET AL</i> , 2000 .....	35
CUADRO 6. VOLUMEN Y CONCENTRACIÓN DE LOS INICIADORES PARA LA DETECCIÓN DEL GEN DE LA POLIMERASA DEL AHV1 DESPUÉS DE SER RECONSTITUIDOS.....	35
CUADRO 7. CONSTANTES DE PCR PARA EL SITIO DE CLONACIÓN (MCS) DEL PLÁSMIDO PUC57 POLDEV .	36
CUADRO 8. LISTADO DE MUESTRAS POSITIVAS A AHV1 DURANTE LOS MESES DE ENERO A FEBRERO DEL AÑO 2016 EN LA LAGUNA DE CHICONAHUAPAN DE LAS CIÉNEGAS DE LERMA, ESTADO DE MÉXICO ....	36
CUADRO 9. CUANTIFICACIÓN DEL PURIFICADO DE ADN, OBTENIDO DE LAS MUESTRAS POSTERIOR A LA EXTRACCIÓN EN GEL CONSTITUTIVO .....	36

## ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

AHV1	<i>Anatid alphaherpesvirus 1</i>
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
DHAV-1	Virus de la hepatitis viral del pato
DPV	Virus de la enteritis viral de los patos
DTMUV	Virus Tembusu de los patos
MPDV	Parvovirus del pato moscovita
ARV	Reovirus del pato moscovita
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Kb	Kilobases
G-C	Guanina- Citocina
UL	Región única larga
US	Región única corta
IR	Secuencia de repetición interna
TR	Secuencia de repetición terminal
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía Viral
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
GenBank	Banco genético
SADER	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFU	Unidad de flujo de partículas
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
LAMP	Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
pb	Pares de bases
CENID	Centro Nacional de Investigación Disciplinaria
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Pg	Picogramo
IBDC	Enfermedad del cuerpo de inclusión de las grullas
GEH	Herpesvirus del águila real
BEH	Herpesvirus del águila calva
GHOH	Herpesvirus del búho cornudo
SOH	Herpesvirus del búho de las nieves
PFH	Herpesvirus del halcón peregrino
FHV	Herpesvirus del halcón mexicano
CHV	Herpesvirus de las palomas
ILV	Virus de la laringotraqueítis infecciosa
MVZ	Médico Veterinario Zootecnista
MC	Maestría en Ciencias
MMVZ	Maestría en Medicina Veterinaria y Zootecnia
MCS	Sitio de clonación molecular

## I. MARCO TEÓRICO

### I. I. HERPESVIRUS

El orden de los *Herpesvirales* contiene 4 componentes estructurales que incluyen una envoltura bilipídica, un tegumento amorfo, una cápside icosaédrica con 162 picos de glucoproteína y ADN lineal de doble cadena. El tamaño del genoma va de los 124kb (virus de la varicela del simio de *Alphaherpesvirinae*) a 241 kb (citomegalovirus del chimpancé de *Betaherpesvirinae*), con una relación G-C de 32-75% (McGeoch *et al.*, 2006). Son de genoma complejo con dos regiones únicas, una larga (UL por sus siglas en inglés) y una corta (US por sus siglas en inglés), cada una rodeada por una secuencia de repetición interna (IR, por sus siglas en inglés) y una repetición terminal (TR, por sus siglas en inglés) (Zhao *et al.*, 2009).

### I. II. CLASIFICACIÓN

Los herpesvirus son específicos de especie y pueden causar diversas alteraciones en órganos y tejidos. Por ejemplo en aves, con excepción de la enfermedad de Marek, producen principalmente necrosis en epitelio respiratorio y digestivo (Young, 1995).

Taxonómicamente los herpesvirus de mamíferos, aves y reptiles comparten una extensa relación genética, con un ancestro en común y se dividen de acuerdo a las diferencias con su tropismo celular, organización genómica y contenido genético (McGeoch *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008). Tienen una secuencia genómica y disposición de genes con una homología de identificación de 40 genes conservados, los cuales conservan funciones relacionadas en la replicación de cada virus (Mettenleiter *et al.*, 2009).

De acuerdo con la lista del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, por sus siglas en inglés) están aceptadas tres familias herpesvirales: *Alloherpesviridae*, *Herpesviridae* y *Malacoherpesviridae*. En la familia *Herpesviridae*, se encuentra la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, que consta de cinco géneros; donde los géneros

*Iltovirus* y *Mardivirus* afectan únicamente a aves. Son aceptadas dos especies virales del género *Iltovirus* (*Gallid alphaherpesvirus 1*, *Psittacid alphaherpesvirus 1*) y cinco especies virales en la familia *Mardivirus* (*Anatid alphaherpesvirus 1*, *Columbid alphaherpesvirus 1*, *Gallid alphaherpesvirus 2*, *Gallid alphaherpesvirus 3*, *Meleagrid alphaherpesvirus 1*). Existe registro de otras especies virales, pero no han sido aceptadas por el ICTV; pero si en la sección sin clasificar del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

### I. III. ENFERMEDADES HERPESVIRALES AVIARES

Las enfermedades herpesvirales aviares más estudiadas son la enteritis viral de los patos, Laringotraqueítis y enfermedad de Marek. En México la Laringotraqueítis y la enfermedad de Marek son enzoóticas. La enteritis viral de los patos es una enfermedad que pertenece al grupo 1 del listado las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos de la SADER (Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural), por lo que se le considera exótica.

### I. IV. PATOS SILVESTRES

Los patos silvestres son especies sinantrópicas que migran facultativamente , en su mayoría migran durante el invierno hacia latitudes donde el clima es menos frío (Welsh *et al.*, 2017). Se ha comprobado que son diseminadoras naturales de semillas de plantas, a través de tres mecanismos diferentes: plumas o miembros pélvicos, esófago (por medio de la regurgitación), y en heces (Farmer *et al.*, 2017). Estudios demuestran que los patos migratorios son reservorios naturales para los Influenzavirus tipo A y *Avulavirus aviar* (Papp *et al.*, 2017; Wille *et al.*, 2017a; Yin *et al.*, 2017); así como de bacterias como *Mycobacterium avium*, *Clostridium botulinum*, entre otros. Lo hacen a través de tres mecanismos:1.- acarreadores

biológicos; 2.- acarreadores mecánicos; y 3.- acarreadores u hospedadores de ectoparásitos infectados (Hubálek y Hubá, 2004).

En el caso de los patos, las infecciones virales son las enfermedades infecciosas más importantes que los afectan (Wang *et al.*, 2017). La expansión de la industria productora de patos, la creciente movilidad de humanos y animales, los contaminantes en el agua que disminuyen el estado inmunitario de las aves y otros factores, han creado condiciones favorables para el esparcimiento de los virus (Wang *et al.*, 2017). Los virus de mayor importancia a nivel mundial en los patos son: el virus de la hepatitis viral del pato (DHAV-1), virus de la enteritis viral de los patos (DPV), virus Tembusu de los patos (DTMUV), el parvovirus del pato moscovita (MPDV), el reovirus del pato moscovita (ARV) y el virus de la influenza A (Wang *et al.*, 2017).

## I. V. ENTERITIS VIRAL DE LOS PATOS

### *Agente causal*

La enteritis viral de los patos también es conocida como plaga de los patos (Trapp y Osterrieder, 2008). Es una enfermedad aguda que afecta a los anátidos. Se tiene registro que afecta 48 especies del orden de los Anseriformes (Kaleta *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2009). Es causada por el *Anatid alphaherpesvirus 1* (AHV1), el cual tiene un tamaño de 158 kb, con 4 componentes estructurales que incluyen una envoltura bilipídica, un tegumento amorfo, una cápside icosaédrica con picos de glucoproteína y ADN lineal de doble cadena con un porcentaje G-C de 44.91% (Li *et al.*, 2009). Se inactiva a un pH menor de 3 y de más de 11 (Friend, M. *et al.*, 1999). El virus se replica principalmente en las células epiteliales de la mucosa del tracto digestivo, principalmente en el esófago, timo, bolsa de Fabricio, bazo e hígado en los huéspedes susceptibles siendo las células epiteliales y los linfocitos, el principal sitio de replicación (Shawky and Schat, 2002). A temperatura ambiente (22°C) la infectividad puede durar hasta 30 días (Dhama *et al.*, 2017).

### *Epidemias en patos silvestres*

El primer reporte a nivel mundial fue en Holanda, en 1923 (Pearson *et al.*, 1997). En Estados Unidos, Canadá, algunos países de Europa y Asia, es considerada como enzoótica (Dhama *et al.*, 2017).

En los patos silvestres se tiene el reporte de dos epidemias: la primera en Dakota del Sur y Nueva York en enero de 1973 (hasta entonces era considerada exótica), donde más de 40,000 de 100,000 patos azulones (*Anas platyrhynchos*), un pequeño número de gansos canadienses (*Branta canadensis*) y otras especies, murieron en el Refugio Nacional de vida Silvestres “Lago Andes” mientras inveraban en la región (Pearson *et al.*, 1997). La segunda epidemia fue en febrero de 1994 en los Lagos Finger en la región oeste de Nueva York, donde 12,000 cadáveres fueron recuperados (Friend, M. *et al.*, 1999).

### *Especies susceptibles*

A través de estudios sobre la epidemiología de la infección en aves acuáticas de vuelo libre que evaluó la prevalencia de la infección, diseminación viral y virulencia de 6 cepas virales; se tiene documentada la susceptibilidad de ciertas especies de patos silvestres: el cerceta alas azules o pato media luna (*Spatula discors*), el porrón americano (*Aythya americana*), pato joyuyo o pato de la Florida (*Aix sponsa*), ganso canadiense (*Branta canadensis*), friso (*Mareca strepera*), ánade real o azulón (*Anas platyrhynchos*), moscovita (*Cairina moschata*), pato rabudo o golondrino norteco (*Anas acuta*), de mayor a menor susceptibilidad, respectivamente (Friend, M. *et al.*, 1999; Spieker *et al.*, 1996). La última con una inoculación de  $10^{3.5}$  PFU desarrollaron anticuerpos pero no murieron (Spieker *et al.*, 1996) y durante los brotes naturales de la enfermedad no se han encontrado entre las aves con signos clínicos o muertas. El pato azulón (*Anas platyrhynchos*), es considerado como el reservorio natural de la enfermedad; mientras que la cerceta alas verdes (*Anas crecca*), presenta alta resistencia a las infecciones experimentales (Dhama *et al.*, 2017).

### *Distribución, transmisión y rutas de exposición*

La enteritis viral de los patos tiene una distribución mundial, donde los patos migratorios desempeñan el papel principal en la transmisión y diseminación de la enfermedad en los diferentes continentes (Dhama *et al.*, 2017). Investigaciones refieren que los brotes de la enfermedad son debido a que aves portadoras del virus lo eliminan en heces, las que contaminan el alimento y agua donde aves susceptibles pueden tener contacto. Experimentalmente se ha demostrado que las aves portadoras pueden liberar el virus por más de cuatro años (Dhama *et al.*, 2017), lo cual hacen principalmente durante la primavera, cuando la duración de la luz del día es mayor y coincide con la época de cría; los cuales son eventos fisiológicos estresantes que favorecen la liberación del virus (Friend, M. *et al.*, 1999). Un estudio en granjas productoras de pato en Bangladesh, evidenció una mayor mortalidad y una prevalencia de la enfermedad durante el verano de 12.9% a nivel de granja y 5.82% a nivel de parvada; y en temporada de lluvias de 10.1% a nivel de granja y 4.96% a nivel de parvada (Agency and Development, 2006; Islam *et al.*, 2018).

Otro estudio dividió a las aves acuáticas en 4 grupos: a) patos residentes, b) patos residentes criados en cautiverio, c) patos silvestres invasores y d) patos silvestres de humedales urbanos; determinando que la prevalencia de la infección latente varía según la especie de ave. El pato rabudo (*Anas acuta*), es el que presenta la mayor frecuencia de infección latente con un 8%, pero ninguna de las muestras de cloaca examinadas fueron PCR positivas al virus. De los patos residentes, la cerceta alas azules o pato media luna (*Spatula discors*), y el pato moteado (*Anas fulvigula*), son conocidos por presentar susceptibilidad a la enteritis viral de los patos. De los patos residentes criados en cautiverio, se detectó a 13 con infección latente (8% de frecuencia) (Keel *et al.*, 2013). Se ha reportado la transmisión vertical de la enfermedad pero aún no se ha confirmado (Friend, M. *et al.*, 1999).

La transmisión de la enfermedad se realiza a través de contacto directo con aves infectadas o de forma indirecta con ambientes contaminados con el AHV1 Sandhu y Shawky, 2003; Dhama *et al.*, 2017).

La ruta de exposición al AHV1 tiene un efecto importante en la mortalidad que se puede presentar por la enfermedad, donde los patos silvestres tienen una mayor exposición por vía conjuntival, intranasal u oral (Spieker *et al.*, 1996). Se sabe que se requiere de 100 a 1000 veces más concentración del AHV1 para producir mortalidad vía conjuntival o intranasal en comparación con la vía oral (Spieker *et al.*, 1996). De acuerdo con la tesis de doctorado de Spieker (1970), se reportó que las aves infectadas excretan cerca de  $10^{3.7}$  PFU de AHV1 por ml de heces antes de morir, cantidad suficiente para producir mortalidad seguida de una exposición oral.

#### *Periodo de incubación, signos clínicos, lesiones macroscópicas e histológicas*

El periodo de incubación va de los 4 días en jóvenes a los 7 días en adultos. El periodo patogénico de la enfermedad varía con la edad, donde generalmente es más corto en jóvenes. La mayoría de las aves mueren sin mostrar signos clínicos e inclusive se pueden encontrar cadáveres flotando en la superficie de los humedales (Dhama *et al.*, 2017). La severidad de los signos clínicos que se pueden observar, varían según la especie, edad, sexo, estado inmune y cepa viral (Sandhu & Metwally, 2008; Dhama *et al.*, 2017). En caso de que se presenten signos clínicos, los más comunes son depresión, hipofagia, polidipsia, deshidratación, debilidad, plumas erizadas, rinorrea, ataxia, fotofobia, movimiento involuntario de cabeza y cuello, diarrea verde acuosa, disnea y conjuntivitis (Campagnolo *et al.*, 2001; Sandhu y Shawky, 2003). Se tiene registrada una morbilidad y mortalidad en patos domésticos que va de 5 al 100% (Trapp and Osterrieder, 2008) Se ha reportado una disminución cerca del 50% de la producción de huevo resultando en una pérdida económica significativa (Walker *et al.*, 1970; Campagnolo *et al.*, 2001; Sandhu and Shawky, 2003; Sandhu and Metwally, 2008; Ji *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2017).

Las lesiones dependerán de la especie afectada, edad, estado inmune y la cepa viral (Sandhu y Shawky, 2003). Comúnmente se puede observar daño vascular, coagulopatía intravascular diseminada y necrosis, erupciones en la superficie de la mucosa del tracto digestivo y lesiones degenerativas en órganos parenquimatosos

y linfoides (Dhama *et al.*, 2017). También se puede observar enteritis severa, hemorragias en intestino, cavidades, corazón, pericardio, hígado y bazo, placas en intestino y esófago. (Campagnolo *et al.*, 2001; Sandhu y Shawky, 2003; Dhama *et al.*, 2017). Las lesiones en el tracto digestivo son comunes en cavidad oral, esófago, ciego, recto y cloaca. Las lesiones orales comprometen erosión y la presencia de membranas diftéricas sublinguales. De forma crónica, los patos silvestres presentan erosiones orales en la entrada del ducto la glándula salival sublingual (Burgess *et al.*, 1979; Campagnolo *et al.*, 2001; Sandhu y Shawky, 2003; Dhama *et al.*, 2017). En el intestino se pueden presentar bandas anulares presentes con forma de anillos rojos. Histológicamente debido al daño vascular, los órganos afectados presentan cambios degenerativos, donde se incluyen necrosis en el epitelio del tracto digestivo con infiltración variable de linfocitos y macrófagos en la mucosa y serosa de los tejidos conectivos. Se pueden observar inclusiones citoplasmáticas e intranucleares eosinofílicas en las células epiteliales del tracto digestivo, respiratorio y reproductivo, principalmente (Campagnolo *et al.*, 2001; Dhama *et al.*, 2017). En los órganos parenquimatosos se pueden observar hemorragias, y necrosis focales rodeando las células vasculares (Dhama *et al.*, 2017).

### *Técnicas de diagnóstico*

Las técnicas de diagnóstico disponibles para la detección del AHV1, dependen del propósito que se quiera realizar, donde la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés) establece dos: la identificación del agente y las pruebas serológicas (detección de la respuesta inmune). Con el propósito de identificar el agente, el aislamiento primario del virus se obtendrá de muestras de hígado, bazo y riñón inoculadas en cultivos celulares y embrión de pato. También a través de métodos moleculares mediante PCR punto final (Hansen *et al.*, 2000), PCR tiempo real y LAMP (técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle) estado (Plummer *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2006; Ji

*et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2017). Con esta última, se ha estudiado la prevalencia de la enfermedad en algunas especies de patos silvestres (Woźniakowski *et al.*, 2014).

El protocolo de PCR punto final para identificación del AHV1 que se encuentra en el Manual Terrestre de la OIE, 2018, se basa en la amplificación de una secuencia del gen de la polimerasa del *Anatid alphaherpesvirus 1*, que consta de un producto de PCR de 446 pb, usando los iniciadores: 5´- GAAGGCGGGTATGTAATGTA-3´ (sentido) y 5´-CAAGGCTCTATTCGGTAATG-3´ (contrasentido).

### *Prevención y control*

No existe un tratamiento clínico para la enfermedad. El control y prevención de la transmisión de la enfermedad en producciones de patos, se enfoca en disminuir el contacto entre la población susceptible durante la presentación de epidemias, medidas de bioseguridad y vacunación (Dhama *et al.*, 2017).

En patos silvestres el control de las únicas dos epidemias que se han reportado, se realizó de la siguiente manera: en enero de 1973, en Dakota del Sur y Nueva York donde más de 40,000 de 100,000 patos azulones y un pequeño número de gansos canadienses y otras especies, murieron en el Refugio Nacional de vida Silvestres “Lago Andes”, como método de control de la enfermedad se consideró práctico y efectivo, cerrar el pozo de la bahía Owens, para permitir la congelación y facilitar la dispersión de las aves acuáticas al río Missouri, donde la contaminación fue reducida por descargas de agua de Fort Randall Dam, reduciendo la transmisión del virus, a través de la adición de hipoclorito de calcio en el agua. Adicionalmente se estableció un área de cuarentena hasta la confirmación del diagnóstico, donde los cadáveres fueron incinerados o enterrados; y se colocaron aves centinelas como monitoreo de exposición (Pearson G. L. *et al.*, 1997). El otro reporte fue en febrero de 1994 en los Lagos Finger, en la región oeste de Nueva York, donde 12,000 cadáveres fueron recolectados, incinerados o enterrados (Friend, M. *et al.*, 1999; Converse and Kidd, 2001).

## II. JUSTIFICACIÓN

Estudios con técnicas de secuenciación masiva, también conocida como secuenciación de última generación, realizados en una reducida cantidad de animales en un tiempo y espacio específico, han demostrado que los animales domésticos y silvestres tienen en sus heces una amplia diversidad de familias y géneros virales que en su mayoría corresponden a virus de otros animales, plantas, y bacterias. La cantidad de información obtenida a través de esta tecnología es tan amplia que es difícil entender la participación de los animales en la transmisión y dispersión de virus en salud pública, animal, vegetal y ambiental (Fawaz *et al.*, 2016).

Ramírez-Martínez *et al.*, realizó un estudio sobre virómica en heces de patos migratorios durante los meses de enero a febrero del año 2016 en la laguna de Chiconahuapan de las Ciénegas de Lerma, Estado de México; evidencio la presencia de material genético de diversas familias y géneros virales de aves, peces, plantas, invertebrados y bacterias. Aproximadamente el 85% de las secuencias de nucleótidos encontradas correspondieron a la familia *Herpesviridae*.

Se sabe que los herpesvirus son específicos de huésped y el único herpesvirus conocido a nivel mundial que afecta a los anátidos es el virus de la enteritis de los patos (AHV1). De acuerdo a la OIE en México no se encuentra la presencia del AHV1 y otros herpesvirus en anátidos. No se ha publicado la presencia directa, indirecta del virus o mortalidad en patos en México asociado a este virus.

Como se mencionó anteriormente, la enteritis viral de los patos es una enfermedad que pertenece al grupo 1 del listado las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos de la SADER, por lo que se le considera exótica. Por lo tanto, en las muestras de patos utilizadas por Ramírez-Martínez *et al.* es importante realizar un estudio de diagnóstico del agente viral al que pertenecen estas secuencias de nucleótidos encontradas en las muestras y de ser necesario, realizar la notificación ante el Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica.

### III. HIPÓTESIS

Se espera que haya secuencias de nucleótidos de la familia *Herpesviridae* en las muestras de heces de los patos migratorios, que correspondan al *Anatid alphaherpesvirus 1* que afecta a los anátidos.

### IV. OBJETIVO

Identificar por PCR punto final la presencia del *Anatid alphaherpesvirus 1* en muestras de heces de patos migratorios tomadas durante los meses de enero a febrero del año 2016 en la laguna de Chiconahuapan de las Ciénegas de Lerma, Estado de México.

### V. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. Zona de estudio y selección de las muestras

Se utilizaron 87 muestras de heces del estudio realizado por Ramírez-Martínez *et al*, 2018, tomadas en el humedal del norte (laguna Chiconahuapan) de las Ciénegas de Lerma, en el altiplano central de México, ubicado en el Estado de México dentro del Municipio de Lerma, Almoloya del Río, Texcalyacac y Santa Cruz Atizapán (19°09'34.4"N, 99°29'48.6" W). Esta área está catalogada como uno de los 142 sitios RAMSAR ubicados en territorio mexicano (RAMSAR, 2017). Las heces fueron obtenidas directamente del recto de cadáveres de patos migratorios, de los géneros *Anas*, *Mareca*, *Oxyura* y *Spatula* (cuadro 1), obtenidos por actividad cinegética durante los meses de enero a febrero de 2016, colocadas individualmente en tubos estériles de plástico de 15ml, mantenidas a 4°C hasta su almacenamiento en el laboratorio a -75°C (Ramírez-Martínez *et al*, 2018).

## 2. Estandarización del control interno en las muestras (Hansen *et al*, 2000)

Con el propósito de eliminar los resultados falsos negativos causados por inhibidores de PCR o por pérdida de ADN durante la extracción, se determinó utilizar un control interno exógeno (Intype IC-DNA, Qiagen Cat No: 289980), obteniendo un producto de PCR de 190 pb. Basado en el criterio que, si el control interno es amplificado pero la secuencia objetivo no, indica que la reacción de amplificación fue satisfactoria y que la secuencia objetivo no está presente, o bien, está presente en un número de copias debajo del umbral de detección (Ornelas E., 2018).

Se utilizaron 3 muestras piloto de heces de patos migratorios de la especie *Spatula discors* (antes *Anas discors*) obtenidas durante la época invernal 2014-2015 en las Ciénegas de Lerma que se encontraban almacenadas a -70°C (cuadro 2), se les extrajo el ADN usando protocolo Purelink viral RNA/DNA Mini Kit (Código de catálogo: 12280050).

Previo a la extracción del ADN se realizaron dos alícuotas de cada una de las muestras, una con enzima de DNAsa turbo Buffer y la otra sin enzima, con el propósito de determinar si la extracción final de ADN se ve alterada al usar las enzimas que degradan el DNA endógeno de la muestra (cuadro 3) (figura 1). Se encontró interferencia entre los productos de PCR esperados de los iniciadores del control interno y del plásmido pUC57 PolDev, en una PCR dúplex (figura 2), por lo que se determinó realizar PCR's independientes para cada par de iniciadores.

Se determinó no realizar tratamiento enzimático para el procesamiento de las muestras debido a la disminución en la cuantificación de ng en las muestras, después de la extracción del ADN, y al ser un virus exótico se espera que, en caso de obtener muestras positivas, la cantidad de ADN viral correspondiente al AHV1 se de escasa a nula.

3. Estandarización del testigo positivo del plásmido sintético que contiene el gen de la polimerasa del virus de la enteritis de los patos (pUC57 PolDev).

Se sintetizó un plásmido sintético pUC57 (figura 3), en el laboratorio T4Oligo, manufacturado por ADN Sintético SAPI de CV, y los iniciadores en la empresa SIGMA-ALDRICH (cuadro 4). En el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en Santa Fe, Ciudad de México, siguiendo las instrucciones de uso de productos de PCR y suministros de plásmidos por la empresa GenScript, se centrifugó el plásmido a 6,000 x g por 1 minutos a 4°C y se resuspendió en 30 µl de agua grado molecular para disolver el DNA presente en el vial y finalmente se colocó en el vortex durante 1 minuto.

Posteriormente con 10 µl del vial, se llevó a cabo la transformación bacteriana de *E. coli H5α* (protocolo One Shot® Chemical Transformation). El método QIAGEN® Midiprep # Catálogo 12643, se empleó para la extracción, obteniendo 600µl de plásmido.

Utilizando el Kit TopTaq Master Mix de Qiagen, se realizó el protocolo de PCR (Hansen *et al.*, 2000), establecido por la OIE, el cual se basa en la amplificación de la secuencia del gen de la polimerasa del AHV1 (DP-VAC DNA) de un tamaño de 446 pb con los iniciadores: 5´-GAAGGCGGGTATGTAATGTA-3´(sentido) y 5´-CAAGGCTCTATTCGGTAATG-3´ (contrasentido), siguiendo las siguientes constantes: un primer ciclo de activación de 94°C por 2 minutos, 37°C por 1 minutos y 72°C por 3 minutos; una extensión de 35 ciclos de 94°C por 1 minutos, 55°C por 1 minutos y 72°C por 2 minutos y finalmente una extensión final de 72°C por 7 minutos (cuadro 5). Este protocolo es capaz de detectar desde 1pg de ADN específico al AHV1 sin producir un producto de PCR cuando se realiza con otros herpesvirus aviares (IBDC, GEH, BEH, GHOH, SOH, PFH, FHV, CHV y ILV) (Hansen *et al.*, 1999, 2000).

Los iniciadores fueron reconstituidos con agua grado molecular (cuadro 6), para posteriormente hacer alícuotas a una concentración de 10 µM/ml. Estos iniciadores

amplifican un producto de PCR de 446 pb correspondiente a la inserción del gen de la polimerasa del AHV1 en el plásmido pUC57 PoIDev. Se realizó una PCR punto final en gradiente a 56.9° y 55.4° con el protocolo de Hansen, 2000 utilizando el Kit TopTaq Master Mix, con el propósito de estandarizar el testigo positivo del AHV1 (figura 4).

En caso donde se obtuvieron muestras positivas y descartar que el resultado se haya debido a la contaminación con el plásmido del AHV1, se estandarizó un control positivo del sitio de clonación (MCS), siguiendo las siguientes constantes: un ciclo de activación de 94°C por 3 minutos; una extensión de 35 ciclos de 94°C por 1 minutos, 55°C por 1 minutos y 72°C por 1 minutos y finalmente una extensión final de 72°C por 7 minutos (cuadro 7) y utilizando los iniciadores 5'-GTAAAACGACGGCCAGTG -3' (sentido) y 5'-GGAAACAGCTATGACCATG -3'(contrasentido), esperando que no se amplifique ningún producto de PCR descartando la contaminación. De acuerdo con la información proporcionada por el laboratorio donde se elaboró el plásmido pUC57 PoIDev, su genoma tiene un tamaño de 3475 pb donde se incluye la secuencia del gen de la polimerasa del *Anatid alphaherpesvirus 1* con un tamaño de 446 pb, que inicia en 379 pb y culmina hasta 1332 pb dando un esperado de amplificación para los iniciadores de MCS de aproximadamente 953 pb.

## VI. RESULTADOS

De las 87 muestras de patos silvestres, únicamente 88.5% (77 muestras) amplificaron el producto de PCR de correspondiente al control interno, el resto de las muestras fueron descartadas del estudio (cuadro 1) (figura 5).

De acuerdo con Lorenz (2012), la presencia de dímeros de los iniciadores de menor tamaño al esperado de 190 pb en la electroforesis correspondiente al control interno de las muestras (figura 5), puede deberse a que los iniciadores se hibridaron entre sí en lugar del ADN de la muestra, al ocurrir esto se observa un producto de menos de 100pb en la electroforesis.

Mediante PCR desarrollada por Hansen, *et al*, se detectó en 3 muestras de heces de patos migratorios la presencia del producto de PCR de 446 pb correspondiente al AHV1. Debido a la poca cantidad de muestra de cada una de las aves, no fue posible realizar un gel únicamente con las muestras positivas (figura 6). Las 3 muestras de heces positivas a la presencia de material genético del AHV1 durante los meses de enero a febrero del año 2016 en la laguna de Chiconahuapan de las Ciénegas de Lerma, Estado de México, pertenecen a las especies *Spatula clypeata* (muestra 35), *Mareca americana* (muestra 44) y *Mareca strepera* (muestra 46) (cuadro 8).

Posteriormente a las muestras positivas con los iniciadores del AHV1, se les realizó una PCR con iniciadores del sitio de clonación del plásmido pUC57 PolDev (MCS) descartando un falso positivo (figura 7).

Para saber si la secuenciación de las muestras positivas podía realizarse. Se tomó como base el protocolo del *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, que indica que la concentración adecuada de las muestras posterior a la extracción del producto de PCR en el gel constitutivo es de 3 a 10 ng/μl de muestra, de acuerdo con el tamaño de 446 pb. Únicamente 2 de las 3 muestras, amplificaron una intensidad de banda visible a ojo humano en el gen constitutivo y se procedió a realizar la extracción del ADN, de acuerdo al protocolo para el gel de extracción

Qiaquick Gel Extraction Kit QIAGEN (N CAT. 28704 Y 28706). Obtuvieron una cuantificación de 4.4 ng/μl (muestra 35) y de 5.04 ng/μl (muestra 44) (cuadro 9). El purificado de ADN se envió al Laboratorio de Fisiología Celular para su secuenciación, pero no hubo reacción de secuenciación durante el procesamiento de las muestras, debido a la poca cantidad de muestra.

## VII. DISCUSIÓN

### *Susceptibilidad al AHV1 de las especies en el estudio*

La información disponible relacionada con la resistencia a la enfermedad por patos silvestres es escasa, la mayoría de la información está relacionada a granjas de producción. En este estudio se utilizaron las muestras de 9 especies de patos diferentes de las cuales únicamente se ha demostrado la susceptibilidad de 4 especies: *Spatula discors*, *Mareca strepera*, *Anas acuta* y *Anas crecca*, de mayor a menor susceptibilidad (Friend *et al.*, 1999; Dhama *et al.*, 2017). De las especies que salieron positivas, se tiene registro de la susceptibilidad de *Mareca strepera* que es considerado una especie de mediana susceptibilidad al AHV1 (Friend *et al.*, 1999, Spieker *et al.*, 1996).

Como se mencionó, para que la enfermedad se presente es necesario un aumento en las tasas de contacto entre las especies susceptibles. En México, de acuerdo con el registro de aves acuáticas en las Ciénegas de Lerma hecho por Hernández-Colina *et al.*, se puede inferir que la población de especies altamente susceptibles (*Spatula discors* con 67 ejemplares y *Aythya americana* con 33 ejemplares) es de un 39.21%; las especies medianamente susceptibles (*Mareca strepera* con 44 ejemplares) es de 17.25% y las resistentes (*Anas acuta* con 44 ejemplares y *Anas crecca* con 67 ejemplares) es de 43.52%. Además, no existe registro en México de la presencia del *Anas platyrhynchos*, considerado como el reservorio de la enfermedad. Lo anterior nos indica que la población de los patos silvestres en México tiene una concentración mayor de especies resistentes a la enfermedad, lo que dificulta la presentación de casos de la enfermedad.

### *Eliminación del AHV1 en aves portadoras*

El AHV1 es difícil de monitorear y controlar debido a que los patos pueden establecerse como portadores que son detectados únicamente durante periodos de eliminación activa del virus (Woźniakowski and Samorek-Salamonowicz, 2014).

Se ha reportado el papel de patos silvestres como portadores del virus durante la presentación de epidemias (Woźniakowski *et al*, 2014). Burgess *et al*, demostró que la frecuencia de eliminación viral en un periodo de muestreo de un año es del 69.8%.

Como se mencionó anteriormente, la ruta de exposición al AHV1 en patos silvestres es principalmente por vía oral, conjuntival e intranasal, donde se sabe que se requiere de 100 a 1000 veces más concentración del AHV1 para producir mortalidad vía conjuntival o intranasal en comparación con la vía oral (Spieker *et al.*, 1996). Sin embargo, se sabe que existe una relación entre la densidad de población y la presentación de la enfermedad, siendo mayor la presentación de la enfermedad en altas densidades de población (Spieker *et al.*, 1996). Los patos silvestres se encuentran agrupados en pequeños grupos aislados hasta que los polluelos llegan a la madurez o son capaces de volar, mientras que en las granjas de producción la densidad de población es alta facilitando la transmisión de la enfermedad (Spieker *et al.*, 1996).

De acuerdo con los registros del Instituto Nacional de Transparencia, Acceso a la Información y Protección de Datos Personales (INAI); en el año 2018 se registraron 691 unidades de producción pecuaria (UPPs) con patos dados de alta en el Padrón Ganadero Nacional de la SADER. De estas producciones, únicamente una contenía 1000 patos y estaba ubicada en el estado de Jalisco; el resto de las UPPs tuvieron un promedio de 15 patos o menos cada una. Aunado a lo anterior en México no se encuentra desarrollada la anacultura y la densidad de población de patos no se tiene registrada.

#### *Estado de latencia del virus en las aves infectadas*

Los herpesvirus tienen la capacidad de persistir indefinidamente en el huésped y evadir la respuesta inmune (Robinson *et al.*, 2010). No se sabe cómo el virus entra en estado de latencia ni los mecanismos de infección latente en las aves (Liu *et al.*, 2017). El único modelo en el cual se han explorado los mecanismos de latencia de

los herpesvirus, así como la inducción del virus para la formación de tumores es el virus de la enfermedad de Marek.

Se considera que la infección viral latente está determinada cuando en un mismo huésped, mediante PCR, las muestras de cloaca son negativas pero positivas en muestras del ganglio trigémino (Keel *et al.*, 2012; Dhama *et al.*, 2017). En este estudio únicamente se realizó PCR de muestras de heces tomadas del recto de aves aparentemente sanas. Burgess *et al.*, demostró que en patos aparentemente sanos se puede detectar el virus en cloaca hasta por más de 4 años después de la infección. El realizó varios muestreos de las aves; en unos tomó muestras tanto de cavidad oral como de cloaca y obtuvo un 76% de detección del virus; en otros muestreó únicamente cavidad oral y detectó un 14% del virus; y en otros únicamente muestreó cloaca y detectó un 10 % de virus. Lo que determina que no existe una constante cantidad de eliminación viral por ninguna de las vías. Se propone que la frecuencia (3.44%) de patos positivos en este estudio por PCR al AHV1, puede deberse a un estado de latencia de la enfermedad, donde en aves convalecientes se sabe que el virus puede establecer una infección latente en el ganglio trigémino (TG), tejido linfóide y linfocitos de sangre periférica (Shawky and Schat, 2002; Dhama *et al.*, 2017).

De acuerdo con Burgess *et al.*, evidenció que las aves convalecientes son inmunes a reinfecciones, demostrando la muerte de patos azulones por infecciones persistentes, mostrando de esta forma que la presentación de mortalidad es dependiente a la ruta de exposición y la cepa viral (Dhama, *et al.*, 2017).

Pearson y Cassidy (1997) observaron la ausencia de epizootias de la enteritis viral de los patos en aves acuáticas migratorias durante 20 años del año 1973 al 1993, después de la epizootia del lago Andes en Estados Unidos. Ellos detectaron la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el AHV1 en aves acuáticas hasta por 79 días después de la última muerte registrada por la enteritis viral de los patos en Estados Unidos desde 1978 hasta 1986 (Brand y Docherty, 1988; Converse y Kidd, 2001)

### *Estacionalidad de la enfermedad*

Las aves acuáticas migratorias y los patos silvestres, desempeñan un componente esencial en el ecosistema de humedales (Post *et al.*, 1998; Green y Elmberg, 2014; Viana *et al.*, 2016; Giunchi *et al.*, 2019). El volar desempeña una demanda altamente energética para las aves migratorias (Johansson *et al.*, 2014; Giunchi *et al.*, 2019).

Está comprobado que, en asociación con la urbanización, los factores que afectan la transmisión de patógenos en animales silvestres, incluyen un aumento en la agregación y disponibilidad de recursos que resulta en un aumento en las tasas de contacto, disminución de la biodiversidad, modulación en la inmunidad del huésped y niveles de estrés (Becker and Hall, 2014; Becker *et al.*, 2015; Bradley and Altizer, 2006; Delgado and French, 2012; Patz *et al.*, 2004; Penczykowski *et al.*, 2014; Wille *et al.*, 2017b).

La mortalidad, severidad de la enfermedad y las especies afectadas varían entre cada una de las epidemias que se han registrado. Aproximadamente 86% de las epidemias registradas a nivel mundial se han reportado durante los meses de marzo a junio. En el caso de los Estados Unidos de América, el reporte de las epidemias han sido en granjas de producción de patos, sin embargo el virus no ha sido aislado o identificado (Dhama *et al.*, 2017).

No se tiene registro del comportamiento de la enfermedad o el virus en el continente americano durante la época invernal. En lugares donde la enfermedad es considerada como enzootia, los focos epidémicos principalmente ocurren durante la primavera (Spieker *et al.*, 1996), en regiones cercanas a humedales donde patos domésticos y silvestres pueden llegar a interactuar (Dhama *et al.*, 2017). El muestreo de las aves se realizó durante el periodo invernal, época en la cual los patos migratorios llegan a territorio mexicano. En todo México, los estudios sobre los patos silvestres, son escasos (Colón-quezada, 2009).

De acuerdo a la NOM-046-ZOO-1995, Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica, publicada el 19 de febrero de 1997, esta es una enfermedad de

notificación obligatoria, debido a que se encuentra dentro de la lista 1 (enfermedad exótica) del Acuerdo vigente mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos.

Este es el primer estudio donde se confirma la presencia del AHV1 en México. Se realizó la notificación de manera inmediata ante el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVE), el cual se encuentra interrelacionado con sistemas de vigilancia internacional (como la OIE), este se encargará de la recolección sistemática de datos necesarios, consolidación, evaluación e interpretación de la información, para la propuesta de alternativas sobre las medidas adecuadas a tomar, distribución rápida de la información y de las recomendaciones a las unidades administrativas que deben decidir y actuar en los diferentes niveles organizacionales.

## **VIII. CONCLUSIONES**

La especie viral de herpesvirus aviar detectada por virómica en patos migratorios obtenidos por actividad cinegética durante su estancia invernal en el Estado de México es el *Anatid alphaherpesvirus 1*.

La detección de *Anatid alphaherpesvirus 1* en los patos migratorios evidencia por primera vez su presencia en México. La enfermedad es exótica en México, pero las unidades de producción de patos domésticos deben evitar el contacto directo o indirecto con patos silvestres y su hábitat.

La frecuencia de 3.8% del *Anatid alphaherpesvirus 1* por PCR en heces de patos migratorio sugiere replicación del virus.

La ausencia de la enfermedad del *Anatid alphaherpesvirus 1* en los patos migratorios sugiere la presencia de factores que limitaron la presencia de la enfermedad en el hábitat.

## **IX. PROSPECCIÓN**

Es necesario realizar el aislamiento y caracterización del virus para conocer el origen filogenético, virulencia y posible impacto en la salud de los patos silvestres y domésticos en México.

Considerando el comportamiento de la enfermedad en los patos silvestres donde difícilmente se observan signos clínicos y solo se presenta muerte súbita, se propone realizar el monitoreo de los patos en las Ciénegas de Lerma, para determinar si presentan lesiones relacionadas con la enfermedad y si son positivos al virus por PCR en cloaca y/o ganglio trigémino.

De acuerdo con la Ley General de Vida Silvestre, se necesita autorización por parte de la SEMARNAT para hacer un muestreo de poblaciones silvestres, la cual será otorgada sólo cuando no se afecte con la viabilidad de las poblaciones, especies, hábitats y ecosistemas. Para esto, debido a que no existen estudios previos de la presencia de la enfermedad en poblaciones silvestres, se tienen que muestrear un total de 385 patos en la zona, considerando un 95% de confianza y un error del 5%, lo que implicaría un elevado costo de recolección, manejo y procesamiento de las muestras.

## REFERENCIAS

- Agency, V.L., Development, S.L., 2006. Monitoring the Health of semi-scavenging Ducks in Bangladesh 11–13.
- Becker, D.J., et al., 2015. Linking anthropogenic resources to wildlife-pathogen dynamics: a review and meta-analysis. *Ecol. Lett.* 18, 483–495.
- Becker, D.J., Hall, R.J., 2014. Too much of a good thing: resource provisioning alters infectious disease dynamics in wildlife. *Biol. Lett.* 10. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2014.0309>.
- Biological Resources Division; Milton Friend and J. Christian Franson, technical editors. 1999. Field manual of wildlife diseases: general field procedures and diseases of birds. Washington, D.C.: U.S. Dept. of the Interior, U.S. Geological Survey: [Supt. of Docs., U.S. G.P.O., distributor]
- Bradley, C.A., Altizer, S., 2006. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends Ecol. Evol.* 22, 95–102.
- Branda, C.J., Docherty, D.E., 2019. Post-Epizootic Surveys of Waterfowl for Duck Plague (Duck Virus Enteritis) Author (s): Christopher J. Brand and Douglas E. Docherty Published by: *American Association of Avian Pathologists* Stable URL: <https://www.jstor.org/stable/1590991> Post-Epiz 32, 722–730.
- Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P and Rohwer F. 2003. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *Journal of Bacteriology*, 185: 6220-6223.
- Burgess EC, Ossa J, Yuill TM. 1979. Duck plague: a carrier state in waterfowl. *Avian Dis.* 23:940–949.
- Campagnolo, E.R., Banerjee, M., ... Jones, R.L., 2001. An Outbreak of Duck Viral Enteritis (Duck Plague) in Domestic Muscovy Ducks (*Cairina moschata domestica*) in Illinois. *Avian Diseases* 45, 522. doi:10.2307/1592999

Comisión Nacional del agua. Manual de atención de brotes de botulismo aviar que se presentan en cuerpos de agua epicontinentales o bienes nacionales a cargo de la Comisión Nacional del Agua. CONAGUA. Guanajuato, México, 2006.

Converse, K.A., Kidd, G.A., 2001. Duck plague epizootics in the United States, 1967-1995. *Journal of Wildlife Diseases* 37, 347–357. doi:10.7589/0090-3558-37.2.347

Delgado, C.A., French, K., 2012. Parasite-bird interactions in urban areas: current evidence and emerging questions. *Landsc. Urban Plan.* 105, 5–14.

Dhama, K., Kumar, N., ... Singh, R.K., 2017. Duck virus enteritis (Duck plague) - A comprehensive update. *Veterinary Quarterly.* 37:1,57-80. doi:10.1080/01652176.2017.1298885

Farmer, J.A., Webb, E.B., ... Bradley, K.W., 2017. Evaluating the potential for weed seed dispersal based on waterfowl consumption and seed viability. *Pest Management Science* 73, 2592–2603. doi:10.1002/ps.4710

Fawaz, M., Vijayakumar, P., ... Raut, A.A., 2016. Duck gut viral metagenome analysis captures snapshot of viral diversity. *Gut Pathogens* 8:30. doi:10.1186/s13099-016-0113-5

Giunchi, D., Baldaccini, N.E., ... Vanni, L., 2019. Spring migratory routes and stopover duration of satellite-tracked Eurasian Teals *Anas crecca* wintering in Italy. *Ibis* 161, 117–130. doi:10.1111/ibi.12602

Green, A.J. & Elmberg, J. 2014. Ecosystem services provided by waterbirds. *Biol. Rev.* 89: 105–122.

Hansen, W.R., Nashold, S.W., ... Knudson, D.L., 2000. Diagnosis of Duck Plague in Waterfowl by Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases* 44, 266. doi:10.2307/1592539

Hernández-Colina, A., Yadeun, M., García-Espinosa, G., 2018. Comunidad de aves acuáticas de un humedal protegido en el Estado de México, México. *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología* (19) 1: 85-95. doi:10.28947/hrmo.2018.19.1.310

Hubálek, Z., 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*. 40 (4): 639-659. doi:10.7589/0090-3558-40.4.639

ICTV Clasificación de las familias virales [citado el 27 de octubre del 2019] disponible en internet desde: <https://data.ictvonline.org/proposals/2005.020-72.04.Herpes.pdf>

Ji, J., Du, LiQ., ... Bee, Y.Z., 2009. Rapid diagnosis of duck plague virus infection by loop-mediated isothermal amplification. *Research in Veterinary Science* 87, 53–58. doi:10.1016/j.rvsc.2008.11.003

Johansson, C.L., Muijres, F.T. & Hedenström, A. 2014. The physics of animal locomotion. In Hansson, L.A. & Akesson S. (eds) *Animal Movement across Scales*: 232–252. Oxford: Oxford University Press.

Kaleta, E.F., Kuczka, A., ... Yilmaz, A., 2007. Outbreak of duck plague (duck herpesvirus enteritis) in numerous species of captive ducks and geese in temporal conjunction with enforced biosecurity (in-house keeping) due to the threat of avian influenza A virus of the subtype Asia H5N1. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 114, 3–11.

Kevin Keel, M., Stallknecht, D., ... Fischer, J.R., 2013. The epizootiology of anamid herpesvirus 1 infection in free-flying waterfowl: A comparison of latent and active infections among native waterfowl, captive-reared released ducks, and peridomestic or feral ducks. *Journal of Wildlife Diseases* 49, 486–491. doi:10.7589/2012-10-250

Khan, K.A., Saha, S., ... Islam, M.A., 2018. Epidemiological investigation of recurrent outbreaks of duck plague in selected Haor (wetland) areas of Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 5 (2): 131-139. doi:10.5455/javar.2018.e256

Li, Y., Huang, B., ... Yang, H., 2009. Molecular characterization of the genome of duck enteritis virus. *Virology* 391, 151–161. doi:10.1016/j.virol.2009.06.018

- Liu, S., Li, H., ... Kong, X., 2008. Phylogeny of duck enteritis virus: Evolutionary relationship in the family Herpesviridae. *Intervirology* 51, 151–165. doi:10.1159/000146865
- Lorenz, T.C., 2012. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 63, e3998. doi:10.3791/3998
- McGeoch, D.J., Rixon, F.J., Davison, A.J., 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research*, 117: 90-104. doi:10.1016/j.virusres.2006.01.002
- Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G., Granzow, H., 2009. Herpesvirus assembly: An update. *Virus Research*. 143: 222-234. doi:10.1016/j.virusres.2009.03.018
- Mokili JL, Rohwer F and Dutilh BE. 2012. Metagenomics and future perspectives in virus Discovery. *Current Opinion in Virology*, 2:63-77. doi:10.1016/j.coviro.2011.12.004.
- NCBI Taxonomía viral [citado el 29 de marzo del 2018] disponible en internet desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=10292&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Ornelas E. (2018) Protocolo de estandarización de qPCR dúplex para la detección de un gen como control interno exógeno heterólogo (Intype IC-DNA, Qiagen Cat No: 289980) y la amplificación de un fragmento del gen 23S rRNA de la familia *Chlamydiaceae*
- Papp, Z., Clark, R.G., ... Soos, C., 2017. The ecology of avian influenza viruses in wild dabbling ducks (*Anas* spp.) in Canada. *PLoS ONE* 12. doi:10.1371/journal.pone.0176297
- Patz, J.A., et al., 2004. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environ. Health Perspect.* 112, 1092–1098.

Pearson, G.L., Cassidy, D.R., 1997. Perspectives on the diagnosis, epizootiology, and control of the 1973 duck plague epizootic in wild waterfowl at Lake Andes, South Dakota. *Journal of Wildlife Diseases*. 33(4): 681-705. doi:10.7589/0090-3558-33.4.681

Penczykowski, R.M., et al., 2014. Poor resource quality lowers transmission potential by changing foraging behaviour. *Funct. Ecol.* 28, 1245–1255.

Plummer, P.J, Alefantis, T., ... Kaplan, AC S., 2018. Detection of Duck Enteritis Virus by Polymerase Chain Reaction Shawky and Karel A . Schat Published by : *American Association of Avian Pathologists Stable* URL : <http://www.jstor.org/stable/1592682> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for th 42, 554–564.

Post, D.M., Taylor, J.P, Kitchell, J.F., Olson, M.H., Schindler, D.E. & Herwig, B.R. 1998. The role of migratory waterfowl as nutrient vectors in a managed wetland. *Conserv. Biol.* 12: 910–920.

Ramírez-Martínez, L.A., Loza-Rubio, E., ... García-Espinosa, G., 2018. Fecal virome composition of migratory wild duck species. *PLoS ONE* (13) 11. doi:10.1371/journal.pone.0206970

RAMSAR. The Ramsar Convention Secretariat Gland, Switzerland.2014 [April, 2018]. Available from: <http://www.ramsar.org/wetland/mexico>.

Robinson, C.M, Hunt, H.D, ... Delany, M.E., 2010. Chromosomal integration of an avian oncogenic herpesvirus reveals telomeric preferences and evidence for lymphoma clonality. *Herpesviridae* 1, 5. doi:10.1186/2042-4280-1-5

Sandhu TS, Shawky SA. 2003. Duck virus enteritis (duck plague). In: Saif YM Barnes HJ Glission JR Fadly AM McDougald LR Swayne DE, editors. *Diseases of poultry*. 11th ed. Ames (IA): Iowa State University Press; p. 354-363.

Sandhu, T.S., Metwally, S.A., 2008. *Diseases of Poultry*, 12th ed. Blackwell, Singapore.

- Shawky, S., Schat, K.A., 2002. Latency Sites and Reactivation of Duck Enteritis Virus. *Avian Diseases* 46, 308–313. doi:10.1637/0005-2086 (2002) 046 [0308: Isarod] 2.0.co; 2
- Spieker, J. O. (1970) Virulence assay and other studies of six North American strains of duck plague virus tested in wild and domestic waterfowl. Ph.D. Thesis. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, 79 p.
- Spieker, J.O., Yuill, T.M., Burgess, E.C., 1996. Virulence of six strains of duck plague virus in eight waterfowl species. *Journal of Wildlife Diseases* 32, 453–460. doi:10.7589/0090-3558-32.3.453
- Trapp, S., Osterrieder, N., 2008. Herpesviruses of Birds, in: Encyclopedia of Virology. Elsevier Ltd. 405–411. doi:10.1016/B978-012374410-4.00442-8
- Viana, D.S., Santamar\_ia, L. & Figuerola, J. 2016. Migratory birds as global dispersal vectors. *Trends Ecol. Evol.* 31:763–775.
- Vinod Kumar, N., Reddy, Y.N., Subba Rao, M.V., 2004. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of duck plague virus. *Indian Veterinary Journal* 81, 481–483.
- Walker, J. W. *et al.* 1969 Status of duck viral enteritis (duck plague) in the United States, *Proceedings of the U.S. Animal Health Association*, 73, 254–279. Available at: <http://pubs.er.usgs.gov/publication/5220036>.
- Wang, Y., Zhu, S., ... Zuo, W., 2017. A multiplex PCR for detection of six viruses in ducks. *Journal of Virological Methods* 248, 172–176. doi:10.1016/j.jviromet.2017.07.004
- Welsh, P.O., Paszkowski, C.A., Tierney, K.B., 2017. Mallards (*Anas platyrhynchos*) and wastewater ponds, Part I: Mallard ducks overwintering at a northern wastewater treatment pond. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143, 330–335. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.10.038

- Wille, M., Lindqvist, K., ... Järhult, J.D., 2017. Urbanization and the dynamics of RNA viruses in Mallards (*Anas platyrhynchos*). *Infection, Genetics and Evolution* 51, 89–97. doi:10.1016/j.meegid.2017.03.019
- Woolcock PR. 2016 Duck virus enteritis. In: Williams SM, Dufour-Zaval L, Jackwood MW, Lee MD, Lupiani B, Reed WM, Spackman E and Woolcok PR. A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens. 6<sup>th</sup> ed. USA: *American Association of avian pathologists*; p. 195-198.
- Woźniakowski, G., Samorek-Salamonowicz, E., 2014. First survey of the occurrence of duck enteritis virus (DEV) in free-ranging Polish water birds. *Archives of Virology* 159, 1439–1444. doi:10.1007/s00705-013-1936-8
- Xie, L., Xie, Z., ... Luo, S., 2017. A polymerase chain reaction assay for detection of virulent and attenuated strains of duck plague virus. *Journal of Virological Methods* 249, 66–68. doi:10.1016/j.jviromet.2017.08.021
- Xie, Z., Khan, M.I., ... Xie, Z., 2006. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction to Detect Avian Encephalomyelitis Virus. *Avian Diseases* 49, 227–230. doi:10.1637/7307-111804r
- Yang, F., Jia, W., ... Yang, W.-L., 2006. Development of Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for Duck Enteritis Virus DNA. *Avian Diseases* 49, 397–400. doi:10.1637/7338-020305r.1
- Yin, S., Kleijn, D., ... De Boer, W.F., 2017. No evidence that migratory geese disperse avian influenza viruses from breeding to wintering ground. *PLoS ONE* 12. doi:10.1371/journal.pone.0177790
- Young, P., 1995. Selected herpesviral diseases of birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 4, 62–71. doi:10.1016/S1055-937X(05)80041-6
- Zhao, Y., Wang, J.W., ... Liu, F., 2009. Molecular analysis of duck enteritis virus US3, US4, and US5 gene. *Virus Genes* 38, 289–294. doi:10.1007/s11262-008-0326-x

# ANEXOS

## Figuras

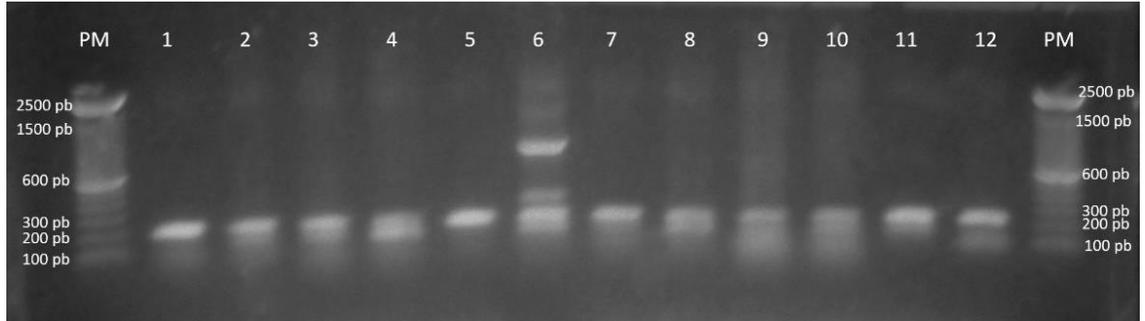


Figura 1. Amplificación del producto de PCR de aproximadamente 190 pb correspondientes al control interno exógeno

PM: marcador de peso molecular. Carriles 1 a 6, ensayo 1; carril 1 y 2 muestra 1 con y sin enzimas; 3 y 4 muestra 2 con y sin enzimas; 5 y 6 muestra 3 con y sin enzimas). Carriles 7 a 12, ensayo 2; carril 7 y 8 muestra 1 con y sin enzimas; 9 y 10 muestra 2 con y sin enzimas; 11 y 12 muestra 3 con y sin enzimas)

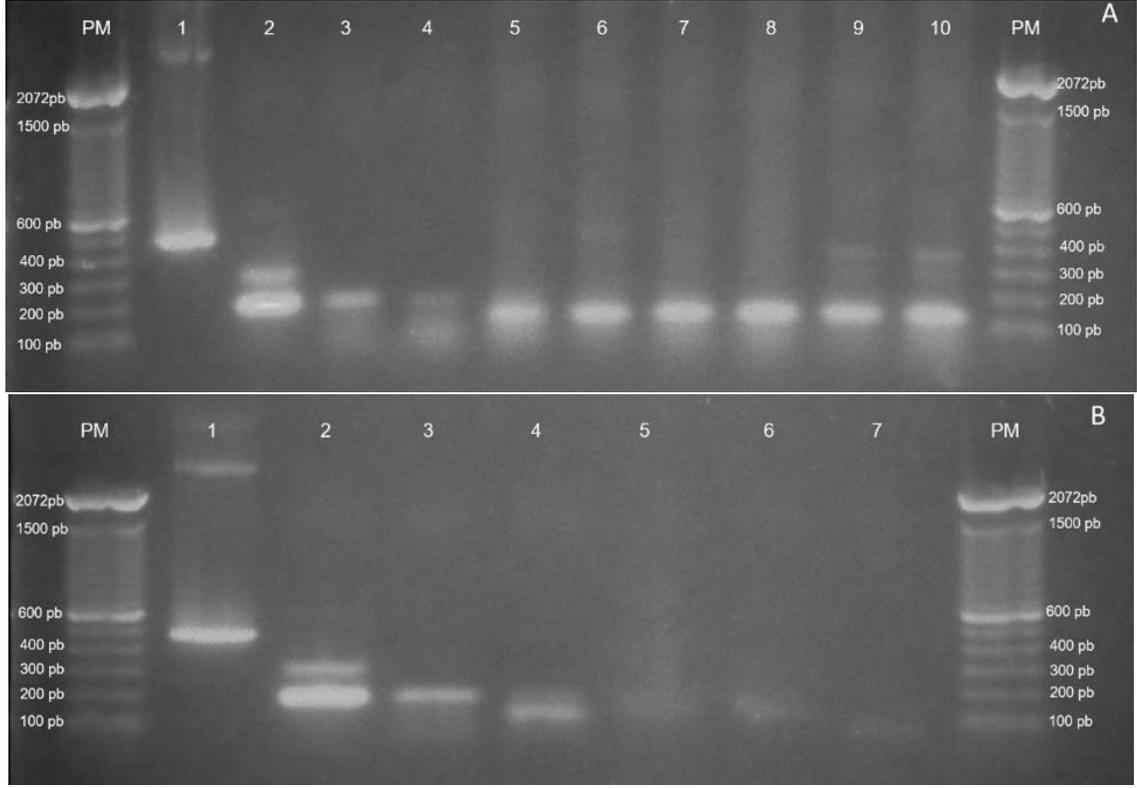


Figura 2. Amplificación de los productos de PCR dúplex del control interno exógeno y plásmido pUC57 PolDev

A. PM: marcador de peso molecular; 1 testigo positivo de pUC57 PolDev; 2 testigo positivo del control interno; 3 y 4 muestra 1 con enzimas; 5 y 6 muestra 1 sin enzimas; 7 y 8 muestra 2 con enzimas; 9 y 10 muestra 2 sin enzimas. B. PM: marcador de peso molecular; 1 testigo positivo de pUC57 PolDev; 2 testigo positivo del control interno; 3 y 4 muestra 3 con enzimas; 5 y 6 muestra 3 sin enzimas; 7 testigo negativo.

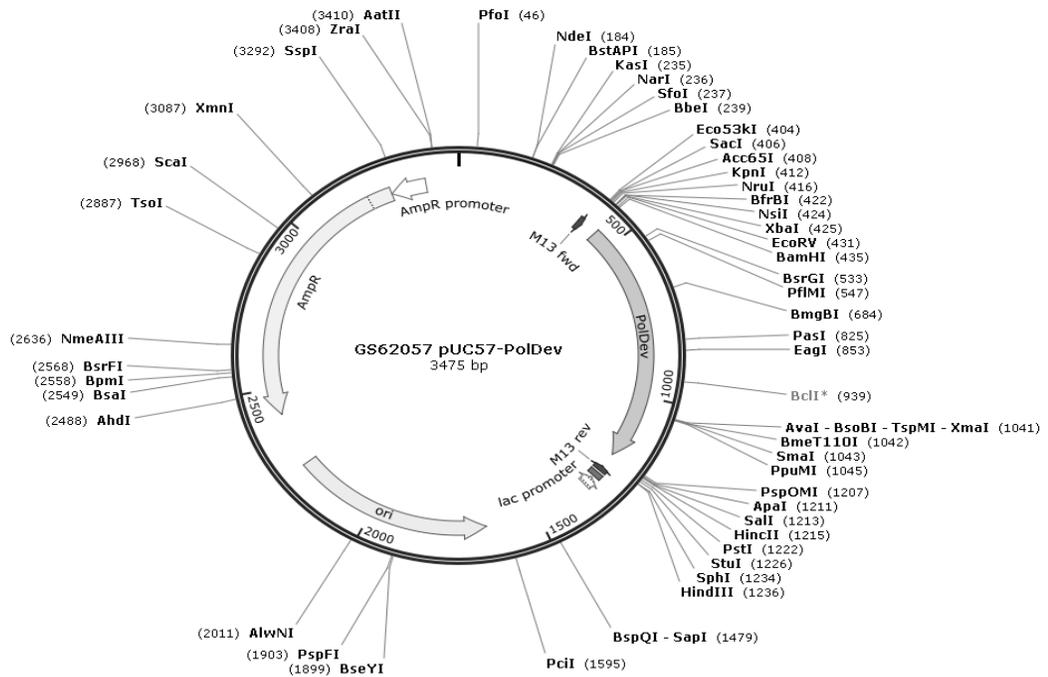


Figura 3. Mapa del plásmido pUC57 con el inserto del gen de la polimerasa del *Anatid alphaherpesvirus 1*

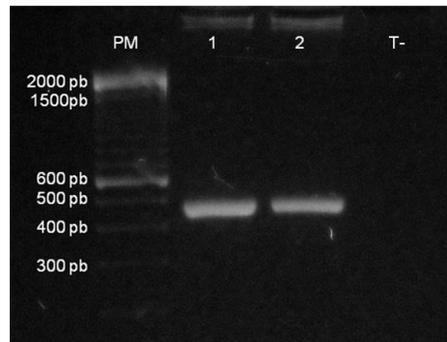


Figura 4. Estandarización del testigo positivo del plásmido pUC57 PolDev correspondiente al gen de la polimerasa del AHV1  
**PM:** Peso molecular; **1 y 2:** la amplificación del producto de PCR esperado; de 446 pb;  
**T-** testigo negativo.

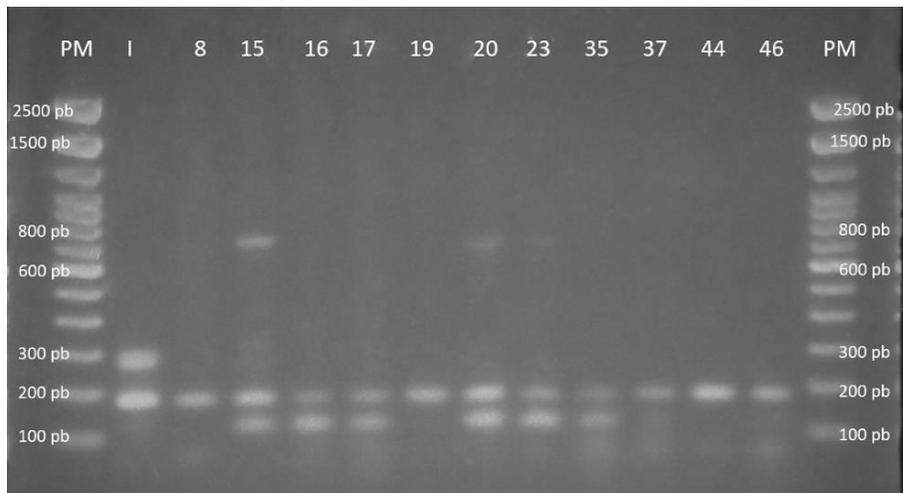


Figura 5. Amplificación del producto de PCR del control interno exógeno heterólogo de aproximadamente 190 pb en las muestras positivas al pUC57 PolDev  
 \*\*PM marcador de peso molecular; I testigo positivo del control interno exógeno heterólogo; El número de los demás carriles pertenece a las muestras positivas al AHV1.

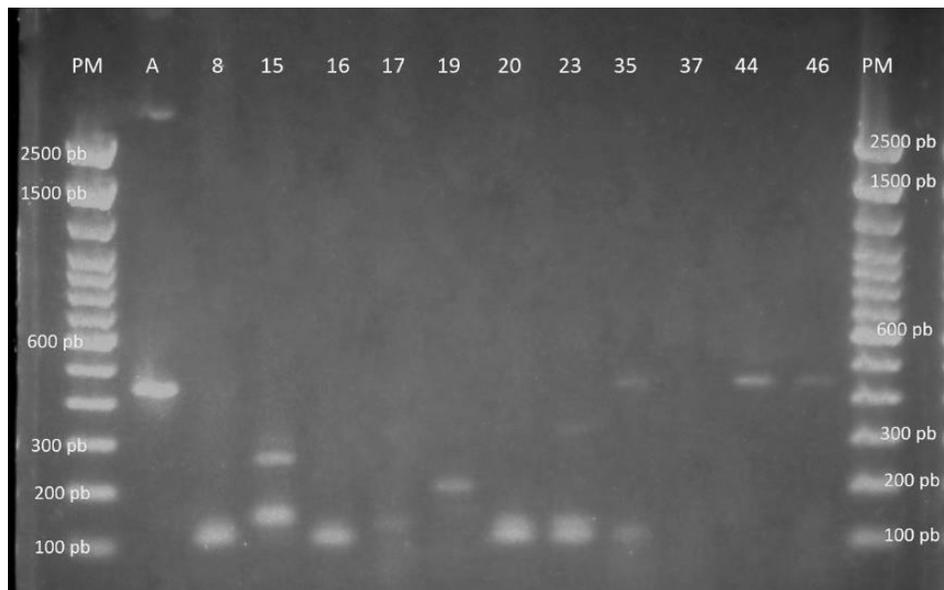


Figura 6. Amplificación del producto de PCR de aproximadamente 446 pb de las muestras positivas al pUC57 PolDev  
 \*\*PM marcador de peso molecular; A testigo positivo del AHV1; El número de los carriles 35, 44 y 46, pertenece a las muestras positivas al AHV1.

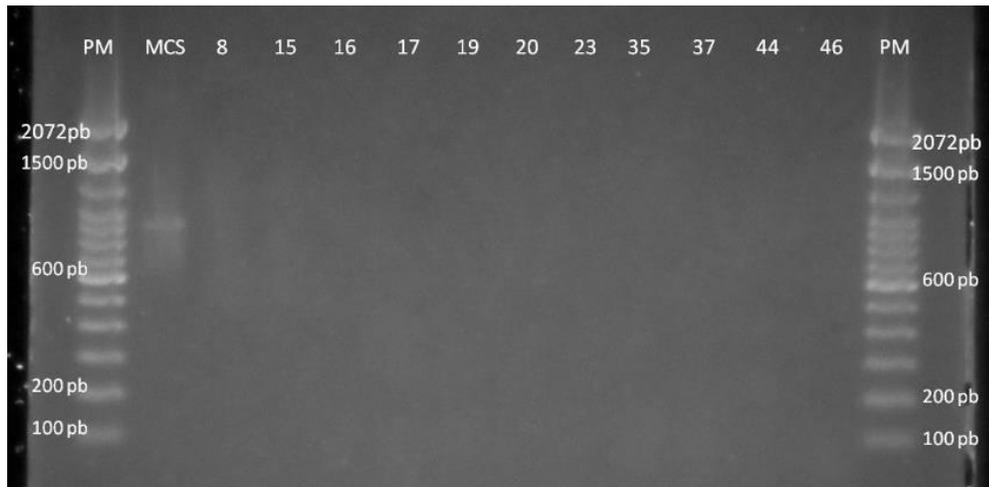


Figura 7. Amplificación del producto de PCR de aproximadamente 956 pb de la región MCS del pUC57 PolDev

\*\*PM marcador de peso molecular; MCS testigo positivo del sitio de clonación del plásmido pUC57 PolDev; El número de los carriles 35, 44 y 46, pertenece a las muestras positivas al AHV1.

## Cuadros

Cuadro 1. Número de patos por especie que fueron analizados durante los meses de enero a febrero del año 2016 en la laguna de Chiconahuapan de las Ciénegas de Lerma, Estado de México

Especie	Número de muestras	Muestras negativas al control interno	Muestras positivas al control interno
1 <i>Anas crecca</i>	2	0	2
2 <i>Spatula discors</i>	3	1	2
3 <i>Spatula cyanoptera</i>	6	0	6
4 <i>Oxyura jamaicensis</i>	8	1	7
5 <i>Anas diazi</i>	8	0	8
6 <i>Anas acuta</i>	10	2	8
7 <i>Mareca americana</i>	15	3	12
8 <i>Mareca strepera</i>	16	1	15
9 <i>Spatula clypeata</i>	19	2	17
Total	87	10	77

Cuadro 2. Identificación de las muestras utilizadas para la estandarización de los protocolos de PCR

Especie	Identificación
<i>Spatula discors</i>	09-11-14 (Pato 12)
<i>Spatula discors</i>	09-11-14 (Pato 1)
<i>Spatula discors</i>	09-11-14 (Pato 13)

Cuadro 3. Cuantificación del material genético en las muestras piloto (NanoDrop 1000)

Muestra		Ensayo 1		Ensayo 2	
		(ng/μl)	260/280	(ng/μl)	260/280
1	Con enzimas	45.2	2.07	64	2.04
	Sin enzimas	234	1.97	434.7	1.91
2	Con enzimas	540	1.92	717.8	2.12
	Sin enzimas	578.5	1.89	957.1	1.98
3	Con enzimas	13.6	2.22	40	1.91
	Sin enzimas	102.1	2.02	102.4	1.91

Cuadro 4. Iniciadores utilizados para la detección del gen de la polimerasa del AHV1

Nombre	Longitud	Tm°	Secuencia	Tamaño
7F-DEV	20	58.9	GAAGGCGGGTATGTAATGTA	446 pb
7R-DEV	20	58.8	CAAGGCTCTATTCGGTAATG	

Cuadro 5. Protocolo de PCR punto final de Hansen *et al*, 2000

	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Activación	1	94	2
		37	1
		72	3
Alineación, extensión	35	94	1
		55	1
		72	2
Extensión final	1	94	1
		55	1
		72	7

Cuadro 6. Volumen y concentración de los iniciadores para la detección del gen de la polimerasa del AHV1 después de ser reconstituidos

Iniciadores	Volumen (µl)	Concentración (µM/ml)
7F-DEV	1162	200
7R-DEV	2052	100

Cuadro 7. Constantes de PCR para el sitio de clonación (MCS) del plásmido pUC57 PolDev

	Número de ciclos	Temperatura (°)	Tiempo (minutos)
Activación	1	94	3
Alineación, extensión	35	94	1
		55	1
		72	1
Extensión final	1	72	7

Cuadro 8. Listado de muestras positivas a AHV1 durante los meses de enero a febrero del año 2016 en la laguna de Chiconahuapan de las Ciénegas de Lerma, Estado de México

IDENTIFICACIÓN	ESPECIE	COLECTA
35	<i>Spatula clypeata</i>	-
44	<i>Mareca americana</i>	24.01.16
46	<i>Mareca strepera</i>	07.02.16

- Sin registro de la fecha de muestreo

Cuadro 9. Cuantificación del purificado de ADN, obtenido de las muestras posterior a la extracción en gel constitutivo

Muestra	(ng/ml)	260/280	260/230
35	4.4	3.21	0.01
44	5.04	5.73	0.01