



Instituto Politécnico Nacional  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación.

**“Monitoreo de Influenza Aviar en aves silvestres  
en humedales de la República Mexicana”**

*P R E S E N T A:*

*LEANDRO DAVID SORIANO GARCÍA*

**TESIS:**

**QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA Y  
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR.**

*DIRECTORES DE TESIS:*

*Dr. Alfonso Méndez Tenorio.      Dr. Héctor Zepeda López.*



*“LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA”*

**MÉXICO, D.F. 2009**



**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MEDICINA DE CONSERVACIÓN DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, DENTRO DEL PROYECTO CGPI 20082655 “MONITOREO DE INFLUENZA AVIAR EN HUMEDALES PRIORITARIOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA” Y CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA CON NÚMERO DE REGISTRO 205402. FORMANO PARTE DEL PLAN ESTRATÉGICO ENTRE AGENCIAS DE EE UU EN EL SISTEMA DE DETECCIÓN TEMPRANA DE INFLUENZA AVIAR ALTAMENTE PATOGÉNICA H5N1 ASIÁTICA EN AVES MIGRATORIAS SILVESTRES EN COLABORACION CON USDA-APHIS Y SEMARNAT. BAJO LA DIRECCIÓN DEL Dr. HECTOR M. ZEPEDA LÓPEZ Y EL Dr. ALFONSO MENDEZ TENORIO.**

## RESUMEN

La influenza es una enfermedad viral aguda muy contagiosa producida por el virus de influenza, el cual pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Se conocen tres tipos A, B, C. El virus C ocasiona una enfermedad muy ligera y no ocasiona brotes o epidemias. En cambio los virus A y B si pueden causar dichos eventos, siendo el virus A el responsable de los grandes brotes que se presentan anualmente mientras que el virus B causa brotes reducidos. El virus de influenza aviar es un virus tipo A y ha sido responsable de tres grandes pandemias en el siglo pasado, causando la muerte a mas de 60 millones de personas. En 1997 se reporta el primer caso de muerte en humanos provocada por el subtipo H5N1 y a partir de esa fecha, hasta el día de hoy los hallazgos del subtipo en aves y humanos se han extendido a lo largo del continente Europeo, Asiático y Africano.

Las aves son los portadores naturales de todos los subtipos de influenza A y estas los pueden dispersar por todo el mundo por medio de las rutas migratorias que ocupan para realizar sus movimientos estacionales, los cuales pueden abarcar desde cientos de kilómetros y hasta llegar a ser transcontinentales. En México existen cuatro rutas migratorias principales (Pacífico, Centro, Golfo y Atlántico), de las cuales la del Pacífico y Centro cobran mayor interés para la dispersión de este virus ya que estas rutas presentan un punto de encuentro en Alaska con la ruta Australasiática.

Es por esto la importancia que tiene el realizar un monitoreo para detectar la presencia de este virus en aves migratorias y regionales en humedales de México.

Se colectaron muestras traqueales y cloacales de 4694 aves correspondientes a 13 ordenes, 34 familias y 138 especies en 28 humedales prioritarios de la república mexicana. Se detectó la presencia del virus mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, dando como resultado 15 muestras positivas, las cuales corresponden a un 0.46% de muestras positivas para el orden de *Anseriformes* (13/2796), 0.57% para el orden de *Ciconiiformes* (1/173) y 0.56% para el orden de *Gruiformes* (1/177). Las muestras positivas se encontraron en 7 de los 28 humedales estudiados y están distribuidas en cada una de las cuatro rutas migratorias teniendo una mayor presencia en la ruta del centro. Se encontró una muestra positiva al subtipo H5 dentro de la ruta del Centro.

## ABSTRACT

Flu is a very contagious acute disease which etiologic agent is the influenza virus that belongs to the Orthomyxoviridae family. There are known three types: A, B and C. Type C virus causes a slight disease, and has not been responsive for epidemics. In the other hand, type A and B virus have been related to several epidemic events, being type A the cause of annual elevated indices of infection.

Avian flu virus is a type A virus, and has caused three great epidemics in the last century, including the death of more than 60 millions of humans.

In 1997 was reported the first human death caused by the H5N1 subtype, and since then, this subtype has spread in humans and birds along Europe, Asia and Africa. Birds are considered as the natural hosts of all type A influenza virus subtypes and can spread them across the world by using migratory routes, traveling between continents.

There exist four migratory routes across México (Pacific, Center, Gulf and Atlantic routes), being the most important for the virus transmission the Pacific and Center routes because they have cross points with the Alaska-Asia route. Because of this, is necessary to scan the prevalence indices in migratory and resident birds in México.

4694 samples were collected from 13 orders, 34 families, and 138 species in 28 Mexican wetlands. Avian flu virus was detected by the real time RT-PCR technique in 15 samples, corresponding to a 0.46% for the Anseriformes order (13/2796), 0.57% for the Ciconiformes order (1/173) and a 0.56% for the Gruiformes order (1/177).

Positive results were obtained from seven of the twenty-eight studied wetlands and are distributed in each of the four migratory routes, preferably in the center route. One sample was identified as the H5 subtype, located in the center route.

# ÍNDICE

	Página
I.I Introducción	1
1) historia de la enfermedad	1
a) Pandemia de 1918	1
b) Pandemia de 1957	2
c) Pandemia de 1968	3
2. Influenza Aviar	4
3. Clasificación taxonómica	4
4. Virus de influenza en aves	6
5. Virus de Influenza Aviar de alta patogenicidad H5N1	8
6. Pruebas de detección de Influenza aviar.	9
7. Humedales de México.	10
I.II Justificación	12
I.III Objetivos	13
A) General	
B) Particulares	
II Materiales y Métodos	14
Diagrame de Flujo	14
a) Obtención de muestras	15

b) Análisis de muestras	18
c) Extracción de RNA	18
d) RT-PCR en tiempo real	19
III. Resultados	23
III.I Discusión	30
IV. Conclusiones	36
V. Bibliografía	37
Consultas URL	39

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Iniciadores y sondas.	20
Tabla 2. Condiciones de termociclado.	21
Tabla 3. Condiciones para los iniciadores	21
Tabla 4. Volúmenes de mezclas de reacción.	24
Tabla 5. Humedales monitoreados.	23
Tabla 6. Muestras obtenidas	25
Tabla 7. Muestras positivas.	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Origen de los virus pandémicos.	3
Figura 2. Diagrama del virión de Influenza	5
Figura 3. Rutas migratorias de aves.	7
Figura 4. Áreas confirmadas con casos de IA H5N1.	9
Figura 5. Humedales	11
Figura 6. Mecanismos de acción de las sondas de hidrólisis.	23

Figura 7. Gráfica de porcentaje de aves muestreadas en base a los estados monitoreados.	24
Figura 8. Ubicación de los humedales monitoreados.	25
Figura 9. Gráfica de porcentaje de aves muestreadas en base a su orden taxonómico.	26
Figura 10. Gráfica de adquisición de fluorescencia de muestras positivas.	27
Figura 11. Aves positivas al virus de influenza tipo A.	28
Figura 12. Distribución de muestras positivas	29
Figura 13. Rutas migratorias de Norte América.	32
Figura 14. Agrupación de aves.	33
Figura 15. Gráfica de adquisición de fluorescencia de muestras sospechosas.	34



# MONITOREO DE INFLUENZA AVIAR EN AVES SILVESTRES EN HUMEDALES DE LA REPÚBLICA MEXICANA

## I. INTRODUCCION

### 1. Historia de la enfermedad de influenza.

La influenza es una enfermedad viral aguda muy contagiosa que se presenta con mayor intensidad durante los meses de octubre a mayo. En general, la mayor parte de los casos se recuperan en un lapso de tres a siete días, pero los ancianos o personas con enfermedades crónicas degenerativas (pulmonares, cardíacas, renales, diabetes) pueden presentar complicaciones graves. Ésta enfermedad es producida por los virus A, B y C de la Influenza. El virus C ocasiona una enfermedad muy ligera y no ocasiona brotes o epidemias. En cambio los virus A y B si pueden causar dichos eventos. El virus A es el responsable de los grandes brotes que se presentan anualmente mientras que el virus B causa brotes reducidos (URL 7).

La primera descripción de un padecimiento identificable como influenza la realizó Hipócrates en el año 492 A.C. Más tarde, durante la edad media, se describieron numerosos episodios relacionados con este mal. En América, la primera descripción de un problema respiratorio severo de este tipo se documentó en Texcoco en 1552 y se le denominó "pestilencia catarral". No obstante, la primera epidemia reconocida ocurrió en 1580 a la que los italianos describieron como la "influenza planetaria", por la asociación que hicieron con una serie de fenómenos astrales observados antes del brote, de donde se derivó el nombre actual de influenza (García *et al.* 2006).

Durante el siglo pasado se presentaron tres pandemias debido a virus de influenza A.

#### **a) Pandemia de 1918 (H1N1) Influenza española**

La pandemia con el virus del subtipo H1N1 se identificó durante el mes de mayo en el fuerte Funston (Kansas,EUA) donde se notificaron enfermos con una mortalidad moderada. El brote se difundió a otros centros de reclutamiento militar durante ese mes, quizá por la movilización de soldados infectados; el virus causó un cuadro respiratorio agudo. Las instalaciones de los servicios médicos fueron insuficientes para atender a los enfermos, por lo que se habilitaron salones de actos y gimnasios para poder brindar la atención médica debida. Durante los meses de junio y julio los soldados norteamericanos fueron trasladados a Francia. A la llegada del ejército estadounidense el virus empezó a difundirse en una segunda oleada, más agresiva que la primera, en que los individuos enfermaban en la mañana, se agravaban por la

tarde y morían en la noche. El brote se extendió a los países de Europa, África, Medio Oriente, Asia y regresó a América a través de buques españoles que llegaron a EUA, Argentina, Brasil y México. Debido a esta situación y al nombre de la estrategia militar a través de España (que en realidad llegó a Francia), se denominó a esta enfermedad como "**influenza española**". La pandemia tuvo tres episodios que concluyeron en octubre de 1919, con la estimación de alrededor de 40 millones de fatalidades en todo el mundo (García *et al.* 2006, Lee-Ligon 2005). La cifra es imprecisa debido al desconocimiento del impacto que tuvo la enfermedad en poblaciones del continente africano, India, países del Medio Oriente, sureste asiático y Sudamérica. En México se documentó el efecto que tuvo en el estado de Sinaloa, donde se notificaron 20,000 muertes de una población total de 350,000 habitantes. La alta virulencia del virus, la falta de inmunidad a este nuevo agente infeccioso, el contacto cercano entre los pacientes y la falta de control de infecciones secundarias contribuyeron de forma notable a incrementar los efectos de la enfermedad. Las investigaciones recientes revelaron que el virus causal fue de origen aviar y que probablemente estuvo evolucionando por un periodo de 5 a 10 años hasta que adquirió la capacidad de transmitirse de manera eficiente entre humanos. Los casos de influenza de los cerdos, identificados de manera simultánea durante la pandemia y con el mismo subtipo de virus H1N1, sugieren la posibilidad de que este animal haya desempeñado un papel importante en la adaptación del virus para infectar a humanos. Se cree que el origen del virus que causó esta pandemia se ubicó en Asia y se sugiere que llegó a América traído por aves migratorias a través del Círculo Polar Ártico (García *et al.*, 2006).

#### **b) Pandemia de 1957 (H2N2) influenza asiática**

La pandemia de 1957 se inició cuando un virus de origen aviar del subtipo H2N2 aportó, mediante un proceso de recombinación, tres genes al virus H1N1 circulante. Los genes donados fueron los de HA, NA y PB1. El virus resultante, con nuevas proteínas HA y NA, con las cuales la población humana no había tenido contacto, se difundió con celeridad en dos oleadas que causaron una elevada morbilidad y una mortalidad que, aunque no fue semejante a la de 1918, se calcula que alcanzó de uno a cuatro millones de personas. Como el origen se identificó en Singapur, se le denominó "influenza asiática". La alerta temprana de un problema respiratorio con elevada morbilidad en Hong Kong, la pronta identificación, caracterización del nuevo

virus de influenza, el rápido desarrollo y distribución de la vacuna específica contribuyeron a minimizar los efectos de la pandemia (García *et al.* 2006, Lee-Ligon 2005).

### c) Pandemia de 1968 (H3N2) Influenza de Hong Kong

El nuevo virus se originó en Hong Kong y produjo una elevada morbilidad, pero limitada mortalidad. La segunda oleada se presentó 12 meses después del pico de la primera y el total de fallecimientos global se estimó en cuatro millones de personas debido a que, en contraste con la detección temprana del virus de la pandemia anterior, en 1968 la detección tuvo lugar de manera tardía y no se produjo vacuna con oportunidad (García *et al.* 2006, Lee-Ligon 2005). Aunque el origen del virus de la primera pandemia no es completamente claro aún, las dos siguientes pandemias fueron causadas por virus que contenían combinaciones de genes de virus de influenza humana y virus de influenza aviar (Figura 1) (Lee-Ligon 2005).

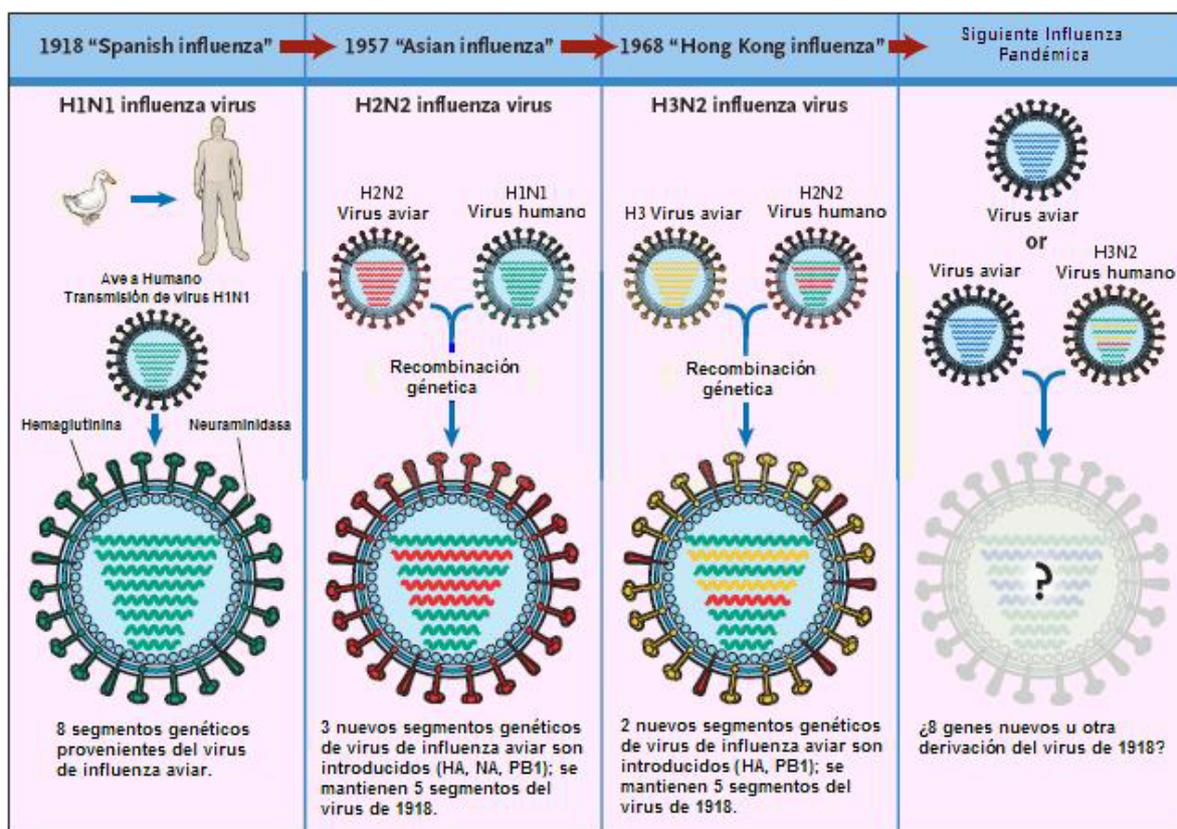


Figura 1. Origen de los virus pandémicos de influenza. En el esquema se observan los orígenes y recombinaciones de virus causantes de las tres pandemias del siglo XX (modificado de Belshe R., 2005).

## 2. Influenza aviar

La influenza aviar o "gripe aviar", es una enfermedad contagiosa de los animales, causada por virus que normalmente sólo infectan a las aves y, con menos frecuencia a los cerdos. Los virus de la influenza aviar son altamente específicos para cada especie pero, en raras ocasiones han cruzado la barrera de especies para infectar a los seres humanos. En las aves de corral domésticas, la infección por los virus de influenza aviar causan dos formas principales de enfermedades, distinguidas por los extremos bajos y altos de la virulencia:

- a. La denominada forma "patógena baja" generalmente sólo causa síntomas leves (plumas contrariadas, una disminución en producción de huevos) y es fácil que no se detecte.
- b. La forma altamente patógena es mucho más notable. Se transmite muy rápidamente por las bandadas avícolas, causando enfermedades que afectan a múltiples órganos internos y tiene una mortalidad que puede acercarse a un 100% dentro de un plazo de 48 horas (URL 3).

## 3. Clasificación taxonómica

El virus de la influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y se clasifica con base a sus diferencias antigénicas en la nucleoproteína (NP) y en la proteína matriz (M1) en los tipos: A, B, y C. Las partículas del virus están constituidas por una bicapa lipídica que se deriva de la célula huésped, en donde se encuentran embebidas las glicoproteínas HA (en mayor proporción), NA y la proteína M2, la proteína Matriz forma una capa interna (Figura 2). Todos los virus de influenza aviar se encuentran clasificadas dentro del tipo A. El genoma consiste de 8 fragmentos únicos de RNA de cadena sencilla con polaridad negativa, los cuales codifican para una proteína cada uno mientras que los fragmentos séptimo y octavo para dos:

**Polimerasa PB1:** Es codificada por el segundo fragmento de RNA, funciona como subunidad catalítica de la RNAPol.

**Polimerasa PB2:** Es codificada por el primer fragmento de RNA, permite el reconocimiento y la unión de la estructura 5'Cap del mRNA de la célula huésped para que pueda ser utilizada como iniciador para la transcripción del mRNA viral.

**Polimerasa PA:** Es codificada por el tercer fragmento de RNA, funciona como RNAPol.

**Hemaglutinina (HA):** Es codificada por el cuarto fragmento de RNA, es la responsable de unir al virión con los receptores de la célula huésped y de posterior fusión. Es el principal antígeno de superficie.

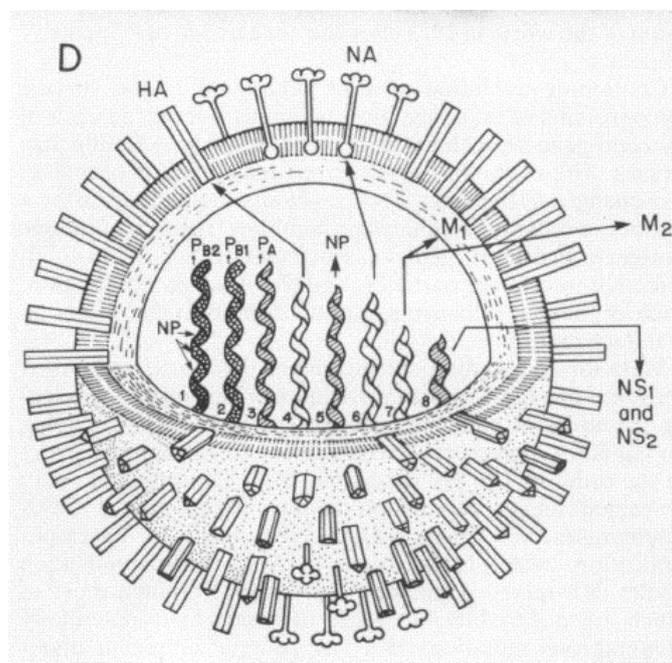
**Nucleoproteína (NP):** Es codificada por el quinto fragmento de RNA, cumple con una función estructural principalmente en la cápside.

**Neuraminidasa (NA):** Es codificada por el sexto fragmento de RNA. Se encuentra como una glicoproteína integral de membrana, ayuda a la liberación de las partículas virales del receptor de la célula huésped y es el segundo mayor antígeno de superficie.

**Proteína M1:** Es codificada por el séptimo fragmento de RNA, apoya en el ensamble viral, proteína Matriz (Matrix).

**Proteína M2:** Es codificada por el séptimo fragmento de RNA, es la encargada de formar el canal iónico para controlar el pH intracelular.

**Proteínas no estructurales NS1 y NS2:** Son codificadas por el octavo segmento de RNA, estas proteínas, particularmente NS1, se encuentran abundantemente en células infectadas (NS1 principalmente en el núcleo y NS2 principalmente en citoplasma) ambas proteínas participan en la replicación del virus pero sus papeles aún no son claros (Webster *et al.* 1992, Hilleman *et al.* 2002).



**Figura 2. Diagrama del virión de Influenza A.** En él se pueden observar las dos principales proteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) la cual es predominante y en menor proporción la neuraminidasa (NA), también se pueden observar dentro de la bicapa lipídica los ocho segmentos de RNA, cada uno codifica para una proteína y en el caso del segmento ocho para dos. Tomado de Hilleman M.2002

Los virus de Influenza A se clasifican en subtipos dependiendo de la especificidad inmunológica de HA y NA. Hasta el momento se han identificado 16 tipos de HA y 9 de NA, lo que genera 144 posibles subtipos (Olsen *et al.* 2006, Fouchier *et al.* 2005, Hilleman *et al.* 2002).

La proteína HA es inicialmente sintetizada como un polipéptido sencillo (HA0), el cual por medio de la acción de las proteasas da lugar a las subunidades HA1 y HA2. El cambio fenotípico de un virus de influenza aviar de baja patogenicidad (**LPAI** por sus siglas en inglés “Low Pathogenic Avian Influenza”) a un fenotipo de alta patogenicidad (**HPAI** por sus siglas en inglés “High Pathogenic Avian Influenza”) se atribuye a la introducción de residuos de aminoácidos básicos en el sitio de segmentación de HA0, que facilita el sistema de replicación del virus (Olsen *et al.* 2006).

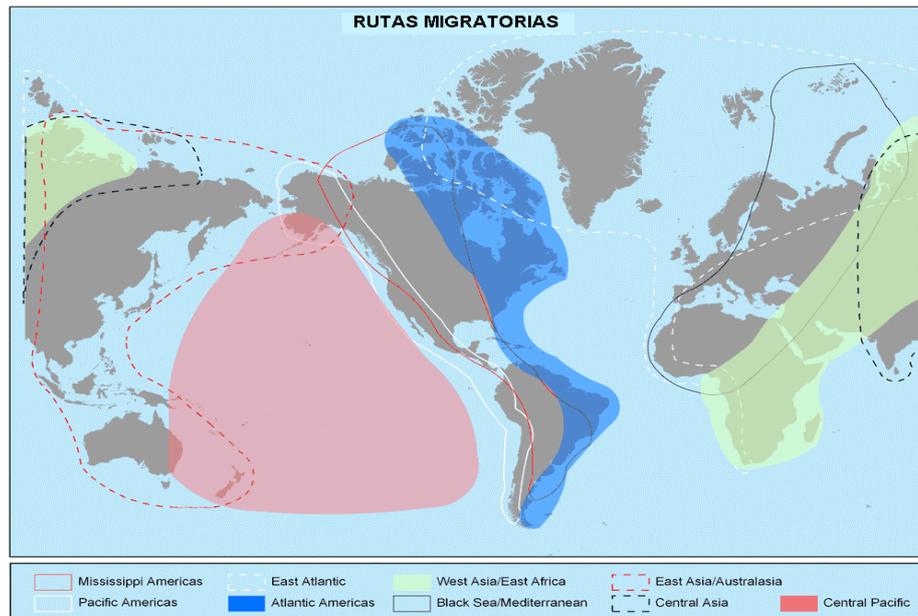
#### **4. Virus de influenza en aves**

Una extensa vigilancia en aves, durante un brote de la enfermedad de Newcastle en aves de corral en California, demostró que muchos virus no patógenos de influenza podían ser aislados en estas. Posteriormente virus de influenza fueron aislados de aves de vida silvestre, aves en cautiverio, patos domésticos, pollos y pavos; lo que llevo a la conclusión de que los virus no patógenos de influenza son ubicuos en aves, particularmente en las aves acuáticas y que todos los diversos subtipos de influenza A (16 H y 9 N) se encuentran presentes en aves acuáticas especialmente en las migratorias (Webster *et al.* 1992).

Las enfermedades asociadas con virus de influenza A en aves varían considerablemente dependiendo del subtipo. Las infecciones causadas por la mayoría de lo subtipos de virus son completamente asintomáticas (Olsen *et al.* 2006; Webster *et al.* 1992; Hilleman *et al.* 2002), algunos subtipos (miembros de los subtipos H5 y H7) producen infección sistémica con implicación del sistema nervioso central y provocan la muerte en una semana (Webster *et al.*, 1992).

La migración es una estrategia común para las aves que ocupan hábitats estacionales y puede extenderse desde los movimientos cortos hasta las migraciones intercontinentales. Estas aves pueden llevar los patógenos particularmente los que no afecten sensiblemente su estado de salud y por lo tanto no interfiera con su migración. Muchos *anseriformes* y *caradriformes* realizan migraciones de distancias regulares a largas, con lo que tienen el potencial de distribuir LPAI entre países y hasta continentes. Las aves que crían en una región

geográfica similar normalmente siguen la misma ruta migratoria (Figura 3). Dentro de los grandes continentes y a lo largo de las principales rutas migratorias, la migración conecta muchas poblaciones de aves en espacio y tiempo, tanto en las áreas de crianza comunes como en las de alimentación. Consecuentemente las aves infectadas con el virus pueden transmitir sus patógenos a otras poblaciones que puedan traer posteriormente los virus a nuevas áreas (Olsen B. 2006; Normile D. 2006).



**Figura 3. Rutas migratorias de aves.** En el mapa se muestran las principales rutas migratorias utilizadas por las aves en todo el mundo y como se interconectan en diferentes zonas. (Tomado de [http:// www.alaska.usgs.gov](http://www.alaska.usgs.gov))

Las aves acuáticas de la familia *Anatidae*, están representadas por los patos, gansos y cisnes. Estas aves constituyen en América del Norte el grupo más importante en torno al cual se genera una gran actividad económica y social a través de su aprovechamiento y observación, lo que ha motivado el desarrollo de programas nacionales e incluso tratados internacionales que buscan la conservación y manejo de estas especies y sus hábitats a lo largo de su rango de distribución.

Por su gran desplazamiento durante la migración, la cual comprende diferentes países, e incluso, continentes y debido a su gran movilidad y a su capacidad de desplazamiento en ámbitos locales y regionales, las aves acuáticas forman parte de un recurso compartido entre países y estados, por lo que su manejo y conservación requiere de un enfoque continental, nacional y regional que atienda las necesidades de las especies migratorias y residentes, para completar su ciclo biológico y que tienda a la conservación a largo plazo de este importante recurso natural (URL 5).

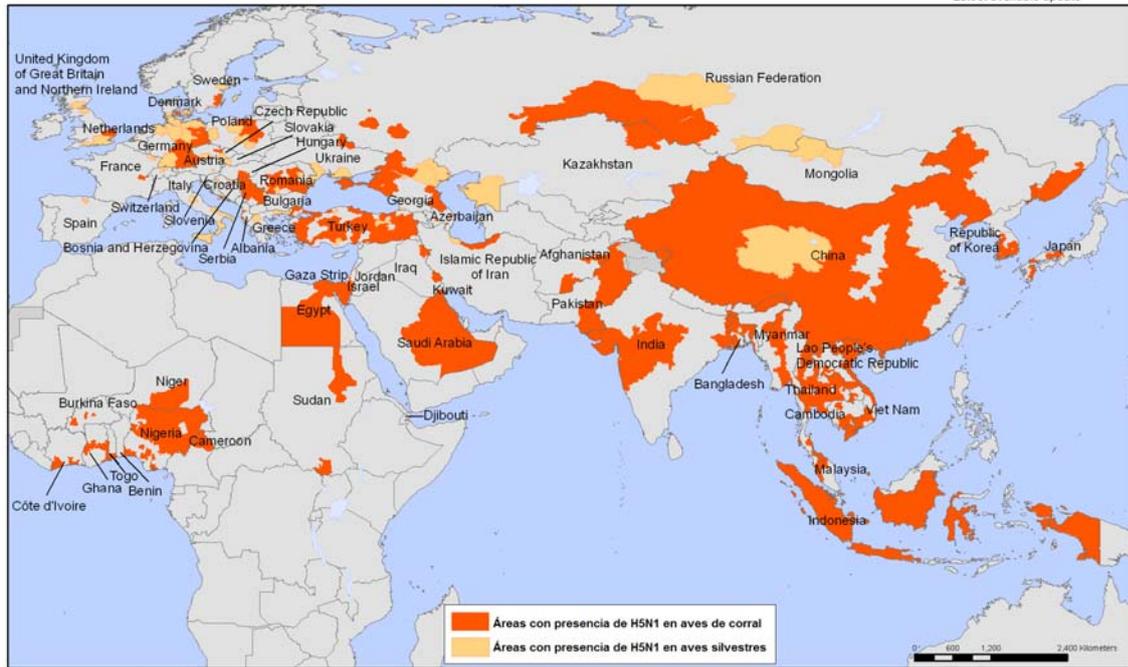
## **5. Virus de influenza Aviar de alta patogenicidad H5N1.**

En 1996 se aisló el virus altamente patógeno H5N1 en un ganso criado en una granja en Hunagdong una provincia de China.

En 1997 se reportaron eventos de H5N1 altamente patógeno en pollos de granjas y de mercados en Hong Kong; en el mes de mayo de ese mismo año se aisló el virus H5N1 de un niño de tres años de edad en Hong Kong el cual muere a causa de los daños provocados por el virus; al final de ese año se presentaron 18 casos humanos con 6 muertes, lo cual se consideró como el posible inicio de una nueva pandemia provocada por un virus de influenza A (Horimoto *et al.* 2001 ,URL 2).

El 30 de Abril del 2005 en el lago Qinghai en la zona central de China, donde varias especies de aves migratorias se congregan, se reportó una mortandad inusual de 6,345 aves de diferentes especies en solo unas semanas. El 6 de julio estudios de aislamiento viral de estas aves sugirieron que la mortandad se debió a una nueva variante de H5N1, la cual es más letal para aves silvestres y ratones infectados experimentalmente (Liu *et al.*, 2005). Poco después otro grupo de investigadores demostró la transmisión del virus entre gansos migratorios y sugirieron que el virus pudo ser acarreado por rutas migratorias invernales (Chen *et al.*, 2005). En agosto del 2005 en Mongolia se reportó la muerte de 89 aves en dos lagos; posteriormente se identificó que H5N1 estaba presente en estas aves. En octubre Croacia reportó H5N1 en aves silvestres; en noviembre Kuwait reportó H5N1 HPIA en un flamenco migratorio; en febrero del 2006 Azerbaijón confirma H5N1 en aves migratorias, Bulgaria, Grecia, Italia, Eslovenia, Irán, Alemania y Hungría confirman H5N1 en cisnes de vida silvestre y Francia confirma H5N1 en pato de vida silvestre (URL 3) (Figura 4).

En este año 22 países (Alemania, Arabia Saudita, Bangladesh, Bulgaria, China, Corea, Egipto, Hong Kong, India, Iran, Israel, Japón , Laos, Nigeria, Pakistán, Reino Unido, Rusia, Suiza, Tailandia, Turquía, Ucrania y Vietnam) han reportado la presencia del subtipo H5N1 en aves domesticas y/o silvestres (URL 8).



**Figura 4. Áreas confirmadas con casos de IA H5N1.** En el mapa se muestra los países en los cuales se han reportado virus H5N1 en aves silvestres (en color amarillo), los países donde se ha reportado H5N1 en aves de corral y en aves de vida silvestre (en verde) y las zonas donde se ha reportado H5N1 en humanos (en rojo). Tomado y modificado de <http://www.who.int>

## 6. Pruebas de detección de IA.

El grupo del Dr. G Catolli realizó pruebas para comparar tres diferentes métodos de detección rápida de Influenza Aviar en muestras obtenidas de hisopos traqueales en el cual comparo una técnica inmunológica “antigen capture enzyme immunoassay” (AC-EIA), y dos técnicas de detección de ácidos nucleicos RT-PCR y Real-Time RT-PCR. Como prueba control se utilizó el aislamiento viral. Los resultados comparados con el aislamiento viral muestran que la prueba que obtiene los valores más altos es la prueba de Real Time RT-PCR al obtener valores de sensibilidad relativa de 93.3%, especificidad del 98.4%, y el valor de K fue de 0.92. Además cuando se realizó el experimento al infectar pavos esta prueba fue la que obtuvo un mayor rango al detectar RNA desde el tercer día hasta el día quince (Cattoli *et al.* 2004; Spackman *et al.* 2002).

## **7. Humedales de México**

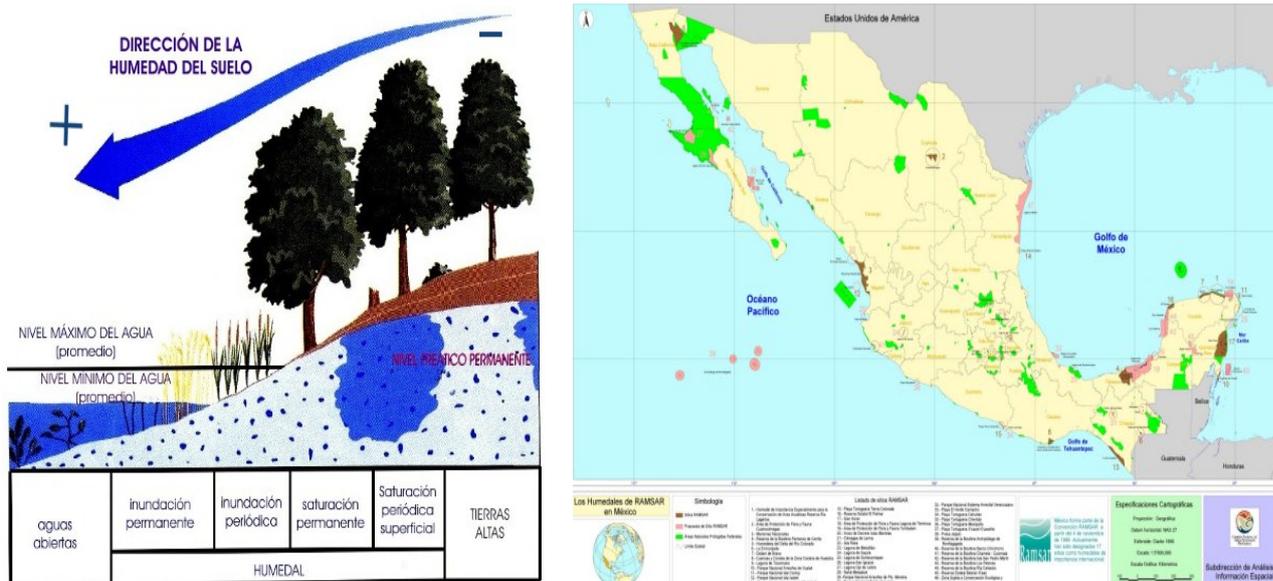
Los humedales son zonas en las que el agua es el principal factor que controla el medio, la vida vegetal y animal relacionada con él. Son sitios donde la capa de agua se halla en o cerca de la superficie de suelo o donde el suelo está cubierto de agua poco profunda.

De acuerdo con la Convención sobre los Humedales "las extensiones de marismas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de aguas, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros" son humedales. Existen cinco tipos principales:

Marinos (humedales costeros, inclusive lagunas costeras, costas rocosas y arrecifes de coral); estuarinos (incluidos deltas, marismas de marea y manglares); Lacustres (humedales asociados con lagos); Ribereños (humedales adyacentes a ríos y arroyos); y Palustres (es decir, "pantanosos" - marismas, pantanos y ciénagas).

Los humedales se encuentran entre los ecosistemas más productivos del mundo. El abastecimiento de agua para consumo humano y para irrigación de cultivos, la gran riqueza de diversidad biológica y, el desarrollo de actividades productivas son algunos de los beneficios de estos sitios.

Las interacciones de los componentes físicos, biológicos y químicos, como los suelos, el agua, las plantas y los animales, hacen posible que los humedales desempeñen muchas funciones, tales como: almacenamiento y purificación de agua; protección contra tormentas y mitigación de crecidas; retención de nutrientes; estabilización de las condiciones climáticas locales, particularmente lluvia y temperatura; estabilización de costas y control de la erosión; entre otros (Figura 5).



**Figura 5. Humedales.** A) Esquematización de las características de un humedal. B) Mapa con los humedales en México reportados por la Comisión Nacional de Áreas Naturales (URL (URL9) Protegidas.

Los humedales son ecosistemas claves para la supervivencia de las especies de aves acuáticas migratorias y residentes. A través del análisis de la información generada por el Servicio de Pesca y Vida Silvestre de los Estados Unidos en los conteos de de medio invierno en nuestro país, DUMAC ha identificado 28 humedales prioritarios que en su conjunto reciben el 84% del total de las aves acuáticas que invernán en México (URL 5).

## **I.II. JUSTIFICACION**

Debido a la importancia a nivel de salud, económica y ecológica, que han tenido los nuevos brotes de influenza aviar en el mundo y debido a la importancia que generan las aves migratorias en la dispersión del virus de Influenza Aviar, es necesario conocer como se encuentra distribuido este virus en las diferentes rutas migratorias de aves que atraviesan el país, con el fin de dar una alerta temprana de la llegada de este virus a nuestro país que permita tomar las medidas preventivas que impidan algún brote de esta enfermedad.

### **I.III. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

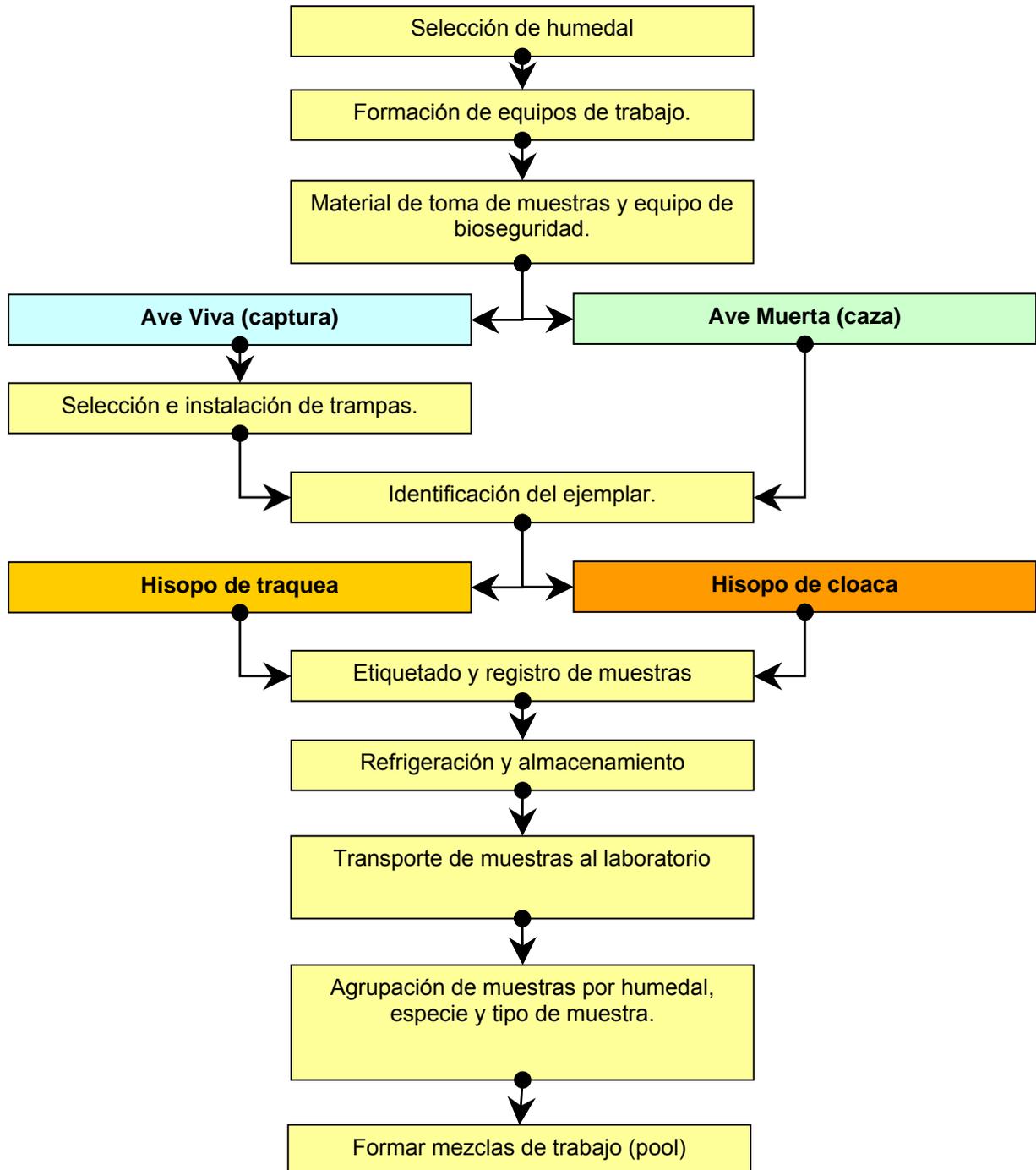
Detectar (mediante la técnica RT-PCR en tiempo real) la presencia de virus de Influenza Aviar en aves acuáticas migratorias y/o regionales en algunos humedales prioritarios de México.

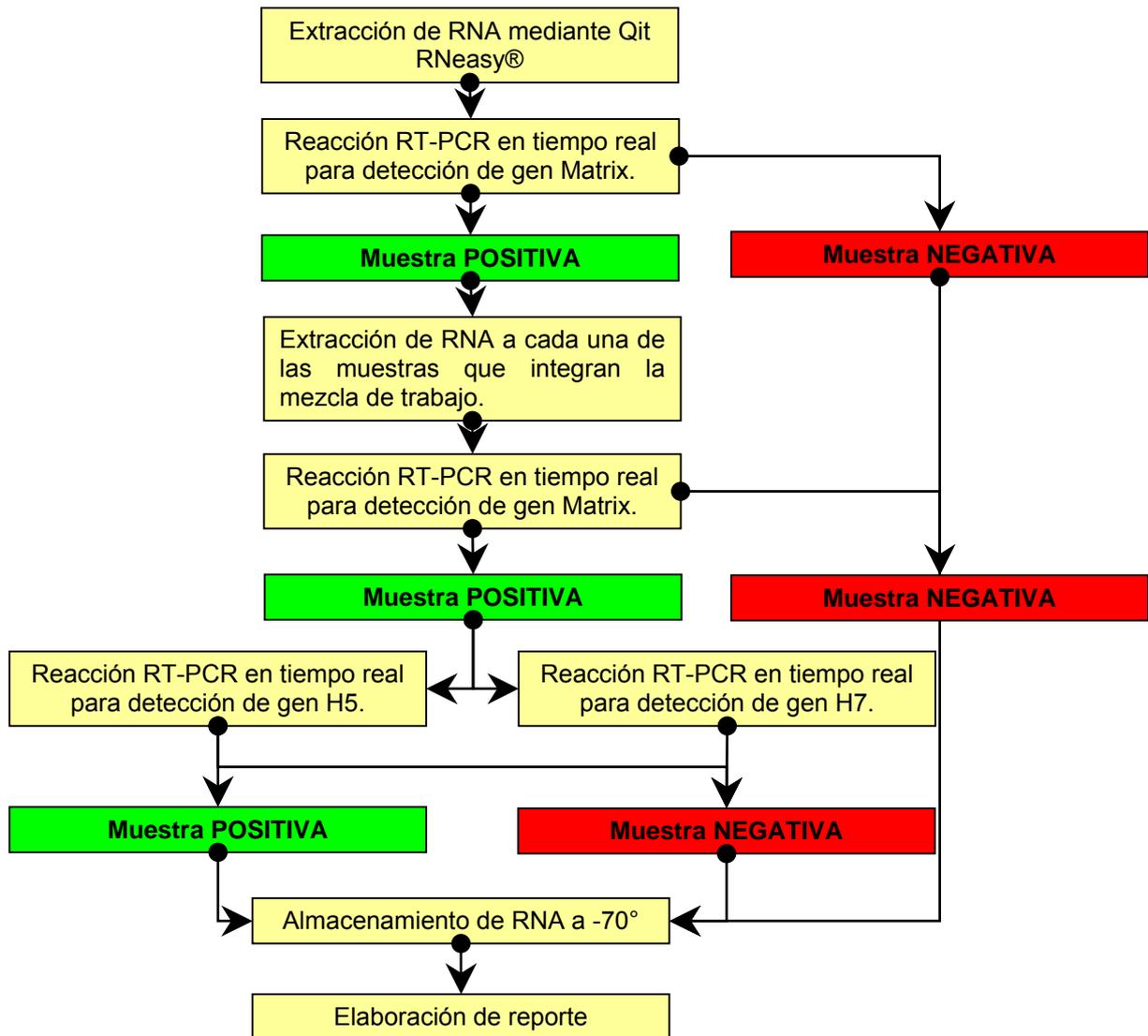
#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener muestras de exudados traqueales y cloacales de diferentes especies de aves acuáticas migratorias y regionales.
- Estandarizar la técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección de virus de Influenza Aviar, H5 y H7.
- Analizar las muestras para la detección de virus de Influenza Aviar.
- Determinar si se encuentran los subtipos H5 y H7 dentro de las muestras positivas.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS<sup>[E1]</sup>

### Diagrama de Flujo.





### a) Obtención de muestras traqueales y cloacales.

Para realizar los monitoreos se contó con el apoyo de las siguientes instituciones: SEMARNAT, USDA-Aphis, WLT, la Procuraduría Federal de protección al Ambiente (PROFEPA), la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), PRONATURA, CIIDIR-IPN y diferentes asociaciones de aprovechamiento cinegético. Se realizó el monitoreo de aves acuáticas migratorias y regionales.

1.- Para animales vivos se realizó mediante captura por medio de redes de niebla y/o trampas.

2.- Para animales que se consideraron muertos (sanos) en este trabajo se utilizaron los ejemplares cazados por los diversos grupos cinegéticos.

3.- En ambos casos se tomaron datos de georeferenciación (mediante GPS) de cada una de las zonas de donde se obtuvieron las muestras.

La mayoría de las cepas de IA tienden a replicarse de manera más eficiente en el tracto intestinal que en el respiratorio de las especies hospedera (por ejemplo, aves acuáticas y costeras). En consecuencia, por lo general se prefieren los exudados cloacales. Sin embargo, las separaciones recientes del virus H5N1 asiático en aves silvestres han documentado niveles mayores de ese virus en las muestras traqueales (Webster *et al.* 2006). Por lo tanto, se recomienda que se recolecten ambas muestras de aves cuando sea posible.

El tamaño de la muestra se obtuvo utilizando la siguiente ecuación, la cual proporciona un método para calcular el tamaño apropiado de la muestra:

$$n = \log (1-c) / \log (1-p).$$

En donde n es el tamaño de la muestra, c es el nivel deseado de confianza, y p es la frecuencia de muestras positivas en la población. Un tamaño de muestra adecuado debe permitir >95% de confianza de que se detecta IA a una frecuencia de  $\leq 1.5\%$ . Estos criterios resultan en un tamaño estimado de muestra de **200**:

$$n = \log (1-.95) / \log (1-0.015) = \mathbf{200}$$

Por lo tanto, se deben recolectar un mínimo de **200** muestras de la población a estudiar (U.S. Interagency Strategic Plan), que para este caso se pueden tomar como 200 muestras de cada uno de los humedales seleccionados, ya que debido a las características de agrupación y convivencia de las aves en sus periodos de migración invernal se pueden considerar como una sola población.

### **Material para toma de muestras.**

Tubos con medio de transporte viral (VTM por sus siglas en inglés Virus Transport Media) o con medio Infusión Cerebro Corazón con antibióticos (BHI por sus siglas en inglés Brain Heart Infusión), hisopos estériles con punta de Dacron, guantes desechables de látex, cubrebocas, batas desechables, lentes de seguridad, cofias, hieleras, refrigerantes y tijeras.

## **Metodología**

Toda la metodología descrita esta basada en la indicada y referenciada por los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios (NVSL), Ames, Iowa. Laboratorios de referencia para la OIE y la FAO.

**NOTA: La identificación de las aves estuvo a cargo por especialistas de diferentes instituciones que participaron en los monitoreos.**

1. Se retiraron de la hielera o del congelador los tubos necesarios para realizar la toma de muestras.
2. Se desenvolvió un hisopo de Dacron abriendo el paquete del lado de la varilla.
3. Se retiró el hisopo y se introdujo la cabeza completa en la **traquea** o **cloaca**. Se utiliza una presión suave y, con un movimiento circular, se paso el hisopo por la circunferencia completa de la traquea/cloaca dos o tres veces.  
Para el exudado cloacal, se eliminaron rastros grandes de heces del hisopo sacudiéndolo.
4. Se desenrosco el tapón del tubo con medio y se colocó el hisopo dentro del tubo con VTM o medio BHI. Con el hisopo ya dentro del medio, se giró el extremo de la varilla del hisopo vigorosamente entre los dedos. Se levantó el hisopo aproximadamente 60 mm del fondo del tubo y se dobló la varilla presionando contra el borde del frasco para romper la varilla de manera que el hisopo permanezca en el tubo y se pudiera colocar el tapón de rosca.
5. Se registró el número de tubo de muestra en la hoja de registro.
6. Se volvió a colocar el tubo en la hielera para su transporte de regreso al campamento. Las muestras se mantuvieron frías (<4 °C, congeladas, de ser posible) y lejos de la luz directa del sol.
7. El envío de las muestras se realizó en contenedores de plástico duro para paquetería con suficientes paquetes de gel congelados para mantener las muestras frías hasta su llegada al laboratorio.

## **b) Análisis de las muestras.**

Para realizar el análisis de las muestras se hicieron mezclas de cinco muestras traqueales y cinco cloacales, las cuales fueron de la misma especie, del mismo sitio anatómico de muestreo y del mismo humedal, para lo cual se tomaron 200µl de cada tubo y fueron transferidos a un tubo eppendorf nuevo y estéril para obtener una mezcla con un volumen de 1 ml, el cual se llamó “mezcla de trabajo o pool”, de esta manera se obtuvo un tubo para una mezcla traqueal y uno para la mezcla cloacal.

## **c) Extracción de RNA**

Se realizó la extracción de RNA a partir de las mezclas de exudado cloacal y traqueal con el kit Qiagen Rneasy método de centrifuga:

Notas:

- Adaptación, por parte del fabricante, del equipo para muestras líquidas.
- Todos los reguladores y reactivos proporcionados en el kit deben prepararse según las instrucciones del mismo.
- Utilizar únicamente reactivos y suministros de grado RNA.

1. Agitar la muestra en movimientos circulares (pools de exudados cloacales o traqueales en BHI u otro medio) durante 3-5 segundos, retire 500 µl y colocar en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

2. Añadir 500 µl de regulador RLT. Cerrar el tubo y agitar la muestra en vortex durante 15 segundos.

3. Añadir 500 µl de etanol al 70% de grado RNA al tubo y mezclar. Centrifugar la mezcla durante 5 minutos a 5000 X g.

4. Añadir 750 µl del sobrenadante del paso 3 a la columna RNeasy y centrifugar durante 15 segundos a 12000 X g, vaciar el flujo continuo del tubo de recolección y repetir el paso con la mezcla restante de muestra/RLT/etanol 70%.

5. Añadir 700 µl de regulador RW1 a la columna RNeasy y centrifugar durante 15 segundos a 12000 X g y colocar la columna en un tubo recolector limpio (el tubo de recolección con flujo continuo RW1 puede desecharse y remplazarse con un tubo de recolección nuevo).

6. Añadir 500 µl de regulador RPE a la columna RNeasy y centrifugar durante 15 segundos a 12000 X g, vaciar el flujo continuo del tubo recolector.

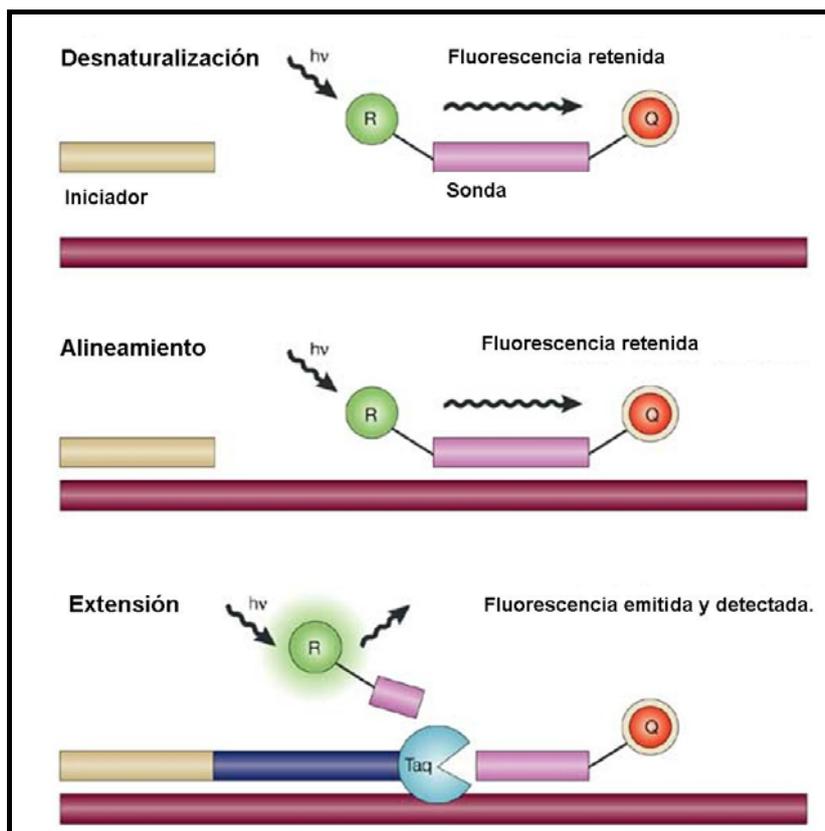
7. Repetir el paso 6 para un total de dos lavados con buffer RPE.

8. Centrifugar la columna RNeasy vaciar durante dos minutos adicionales a 14000 X g y desechar el tubo de recolección.
9. Colocar la columna RNeasy en un tubo de elución (o un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml) y añadir 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa a la columna. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Eluir el RNA por medio de centrifugación durante 1 minuto a 14000 Xg. Desechar la columna RNeasy.
10. Las muestras de RNA pueden almacenarse a 4 °C durante < una semana, el almacenamiento durante más de una semana deberá ser a -70 °C.

#### **d) RT-PCR EN TIEMPO REAL**

Para realizar la búsqueda del virus en las muestras se utilizaron los siguientes iniciadores y sondas para realizar la amplificación de los genes correspondientes (tabla 1).

Se utilizaron sondas de hidrólisis o taqman, las cuales son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Figura 6).



**Figura 6. Mecanismo de acción de las sondas de hidrólisis.** La sonda presenta un reportero y un cebador espacialmente cercanos con lo cual la fluorescencia es retenida por este último. Finalmente por acción de la polimerasa hay un corte en la sonda y la fluorescencia puede ser detectada ya que las moléculas se encuentran alejadas (Modificada de Nature Reviews/ Drug Discovery).

Tabla 1. Iniciadores y sonda. Se muestran los iniciadores y sonda específicos para detectar Influenza Aviar, el subtipo H5 y el subtipo H7. Los iniciadores son los establecidos por los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios (NVSL), Ames, Iowa.

Especificidad		Secuencia
Influenza tipo A – Gen matriz	M+25 5' Primer	5'-AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3'
	M+64 Probe	5'-FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ1-3'
	M-124 3'Primer	5'-TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG-3'
Subtipo H7 – cepas norteamericanas	H7+1244/5 Primer	5'-ATT GGA CAC GAG ACG CAA TG-3'
	H7+1281 Probe	5'-FAM-TAA TGC TGA GCT GTT GGT GGC-BHQ1-3'
	H7-1342 3'Primer	5'-TTC TGA GTC CGC AAG ATC TAT TG-3'
Subtipo H5 – cualquier cepa	H5+1637 Probe	5'-FAM TCA ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-BHQ1-3'
	H5-1685 3'Primer	5'-AGA CCA GCT AYC ATG ATT gC-3'
Subtipo H5 – cepas norteamericanas	H5+1456 NA 5' Primer	5'-ACG TAT GAC TAT CCA CAA TAC TCA-3'
Subtipo H5 – cepas euroasiáticas	H5+1456 EA 5'Primer	5'-ACG TAT GAC TAC CCG CAG TAT TCA-3'

Las condiciones para realizar el RT-PCR en tiempo real se describen en la tabla 2 el paso de retro transcripción y en la tabla 3 las condiciones específicas para los pares de iniciadores y sondas. En la tabla 4 se encuentran los volúmenes necesarios para realizar la reacción.

Tabla 2. Condiciones en el termociclador Light Cycler de Roche®.

Paso de retro-transcripción	1 ciclo	30 min	50 °C
		15 min	95° C

Tabla 3. Condiciones de termociclado para los pares de iniciadores y sonda específicos<sub>[E2]</sub>.

Sonda / Par de iniciadores	Ciclos	Paso	Tiempo	Temperatura
AIV Matriz	45	Desnaturalización	10 seg.	94° C
		Alineamiento*	20 seg.	60° C
H5	40	Desnaturalización	10 seg.	94° C
		Alineamiento*	20 seg.	57° C
		Extensión	5 seg.	72° C
H7	40	Desnaturalización	10 seg.	94° C
		Alineamiento*	20 seg.	58° C
		Extensión	5 seg.	72° C

\* La fluorescencia se registra durante la etapa de alineamiento.

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción

Tabla 4. Volúmenes de mezcla de reacción utilizando el kit Qiagen One-Step RT-PCR<sub>[E3]</sub>.

Componente	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Agua libre de RNasa's	2.4	
Regulador de reacción 5x	4	1x
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1	3.75 mM
Mezcla de enzimas.	0.8	
Iniciador "Forward"	0.5	10 pmol
Iniciador "Reverse"	0.5	10 pmol
dNTP's	0.8	400 mM c/u
Sonda	0.5	0.3 µM
Inhibidor de RNasa's	0.5	0.33 unidades/ µl

Componente	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
BSA (5.0 mg/ml)	1	250 µg / ml
Mezcla de reacción	12	
RNA molde	8	
Volumen total	20	

Nota: En cada corrida se colocó un control positivo y un control negativo. El control positivo fue proporcionado por los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios (NVSL), Ames, Iowa.

Se colocaron 30 reacciones de trabajo (pools) más un testigo de reacción (control negativo) y un control positivo (testigo positivo) en cada corrida del Light Cycler, para las muestras de trabajo que resultaron positivas se realizó la extracción de RNA (bajo el mismo protocolo antes mencionado) de las muestras individuales que lo conformaban para realizar la búsqueda de la muestra individual que le confería el valor positivo a la mezcla de trabajo.

Una vez identificada la muestra positiva para el gen Matriz, se realizó el análisis por medio de RT-PCR en tiempo real para determinar si pertenecían al subtipo H5 o H7.

### III. RESULTADOS

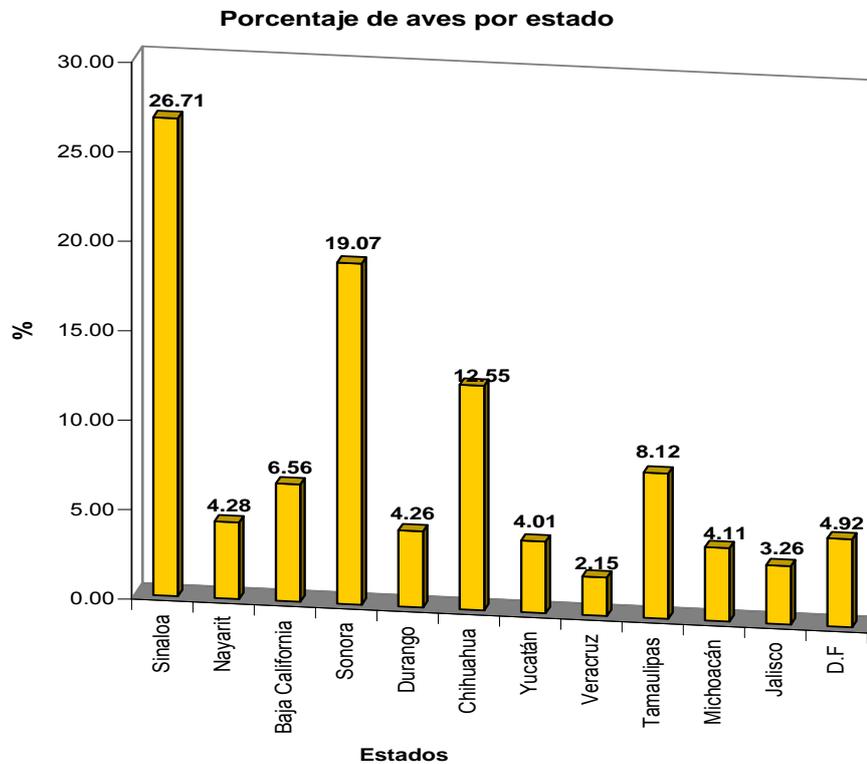
#### a) Obtención de muestras

Se realizó el monitoreo en 28 humedales (tabla 5) en 12 estados de la república Mexicana (Figura 8), de los cuales 17 corresponde a la ruta del Pacífico con un total de 2647 aves muestreadas, siete a la ruta del Centro con un total de 1377 aves muestreadas, tres a la ruta del Golfo con un total de 482 muestreadas y uno a la ruta del Atlántico con un total de 188 aves muestreadas, en la Figura 8 se puede observar el porcentaje de aves colectadas en los diferentes estados de la República Mexicana. donde Sinaloa presenta el mayor porcentaje con 26.71% y Veracruz el menor con el 2.15%, se colectaron muestras de 4694 aves lo que resulto en 4694 muestras traqueales y 4694 muestras cloacales, correspondientes a 13 ordenes, 34 familias y 138 especies (Tabla 6 ), en la gráfica 2 se puede observar cuales son los principales ordenes taxonómicos de las aves colectadas (Tabla 7), se ha reportado que los principales reservorios del virus en aves silvestres son la aves pertenecientes a los ordenes *Charadriiformes* y *Anseriformes* (Webster R. et al.,1992).

Tabla[E4] 5. Humedales monitoreados durante la temporada de migración 2006-2007

Humedal	Estado	Aves muestreadas
Pabellón	Sinaloa	204
Topolobampo	Sinaloa	200
Laguna Caimanero	Sinaloa	210
Navachiste/El Dorado	Sinaloa	200
Bahía Santa María	Sinaloa	200
Agiabampo	Sinaloa	200
Bahía de Ohuira	Sinaloa	40
Marismas Nacionales	Nayarit	201
Bahía Lobos	Sonora	200
Isla Tobarí	Sonora	197
Bahía Santa Bárbara	Sonora	141
Delta del Río Colorado	Sonora	157
Isla Huvilay	Sonora	200
Bahía San Quintín	Baja California	66
Isla Rasa	Baja California	115
Islas Golfo de California	Baja California	85
Isla Guadalupe	Baja California	42
Los Alamos	Durango	200
Mexicanos	Chihuahua	200
Manitoba	Chihuahua	200
Babicora	Chihuahua	189

Humedal	Estado	Aves muestreadas
Lagunas de Campeche	Yucatan	188
Lagunas de Alvarado	Veracruz	101
Delta del Río Tamesi/Panuco	Tamaulipas	181
Delta del Río Bravo	Tamaulipas	200
Lago de Chapala	Jalisco	153
Lago de Cuitzeo	Michoacán	193
Lago de Chapultepec	Distrito Federal	231



[E5]  
**Figura 7. Gráfica de porcentaje de aves muestreadas.** En la gráfica se muestran los porcentajes correspondientes al número de aves muestreadas en los diferentes estados durante el período de migración 2006 – 2007.



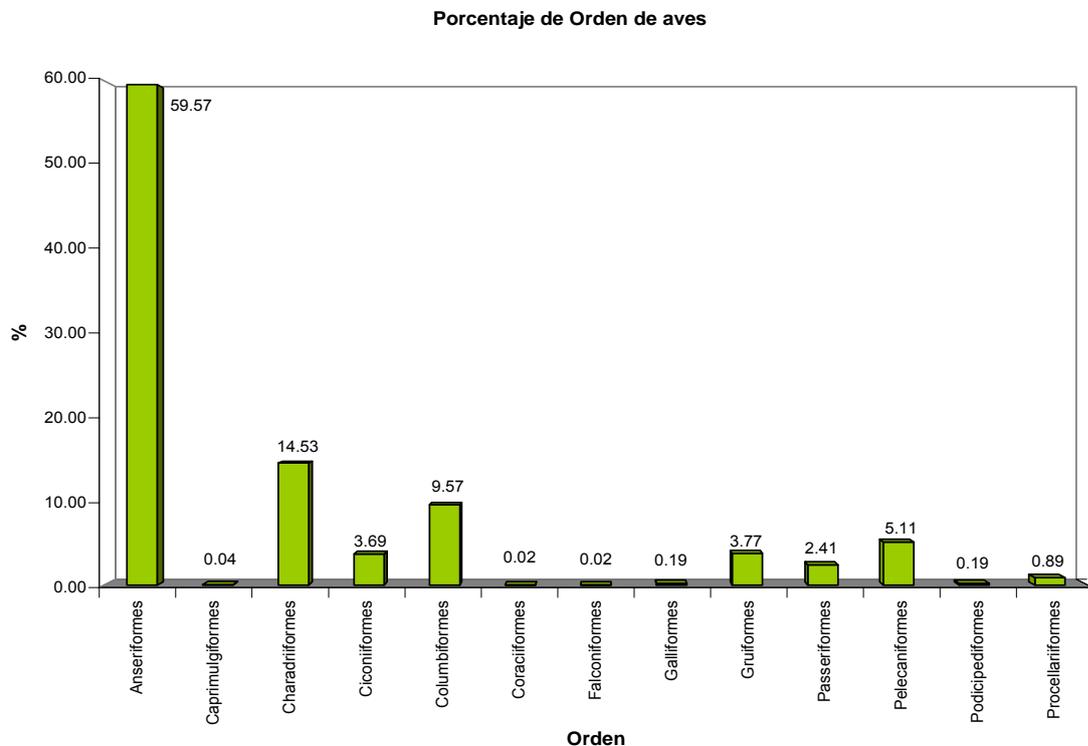
**Figura 8. Ubicación de los humedales monitoreados.** En la figura se marca la localización de cada uno de los humedales prioritarios monitoreados durante el periodo de hibernación 2006 – 2007[E6].

En la tabla 6 se observan las muestras obtenidas en base a su orden taxonómico.

Tabla 6. Muestras obtenidas en base a su Orden taxonómico.

Orden	Cantidad	Porcentaje
<i>Anseriformes</i>	2796	59.57
<i>Caprimulgiformes</i>	2	0.04
<i>Charadriiformes</i>	682	14.53
<i>Ciconiiformes</i>	173	3.69
<i>Columbiformes</i>	449	9.57
<i>Coraciiformes</i>	1	0.02
<i>Falconiformes</i>	1	0.02
<i>Galliformes</i>	9	0.19
<i>Gruiformes</i>	177	3.77
<i>Passeriformes</i>	113	2.41
<i>Pelecaniformes</i>	240	5.11
<i>Podicipediformes</i>	9	0.19
<i>Procellariiformes</i>	42	0.89
<b>TOTAL: 13 Ordenes</b>	<b>4694</b>	<b>100</b>

En la figura 9, se observa que el orden taxonómico de los *Anseriformes* en donde se encuentran patos y gansos es el que presenta un valor mas alto con 59.57% del total de muestras colectadas.



[E7]

**Figura 9. Gráfica de porcentaje de aves muestreadas en base a su orden taxonómico..** En la gráfica se muestra el porcentaje equivalente al número de aves muestreadas en la temporada de migración 2006 – 2007 de acuerdo a su orden taxonómico.

## b) Análisis de muestras.

Después de la extracción de RNA a partir de las mezclas de trabajo, realizo la búsqueda del gen matriz para la detección de influenza tipo A, mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. A partir de las muestra positivas en la mezcla de trabajo se realizo la extracción de RNA de cada una de las muestras que lo integraban para determinar cual de las muestras individuales era positiva (influenza tipo A), a partir del RNA extraído de esta muestra se realizo la técnica de RT-PCR para identificar los subtipos H5 y H7.[E8]

Las gráficas de las muestras positivas a al gen matriz y H5, se observaron con un incremento en la intensidad de fluorescencia antes del ciclo 30 y un aumento final de fluorescencia mayor a cuatro unidades en el ciclo 40 (Figura 10).

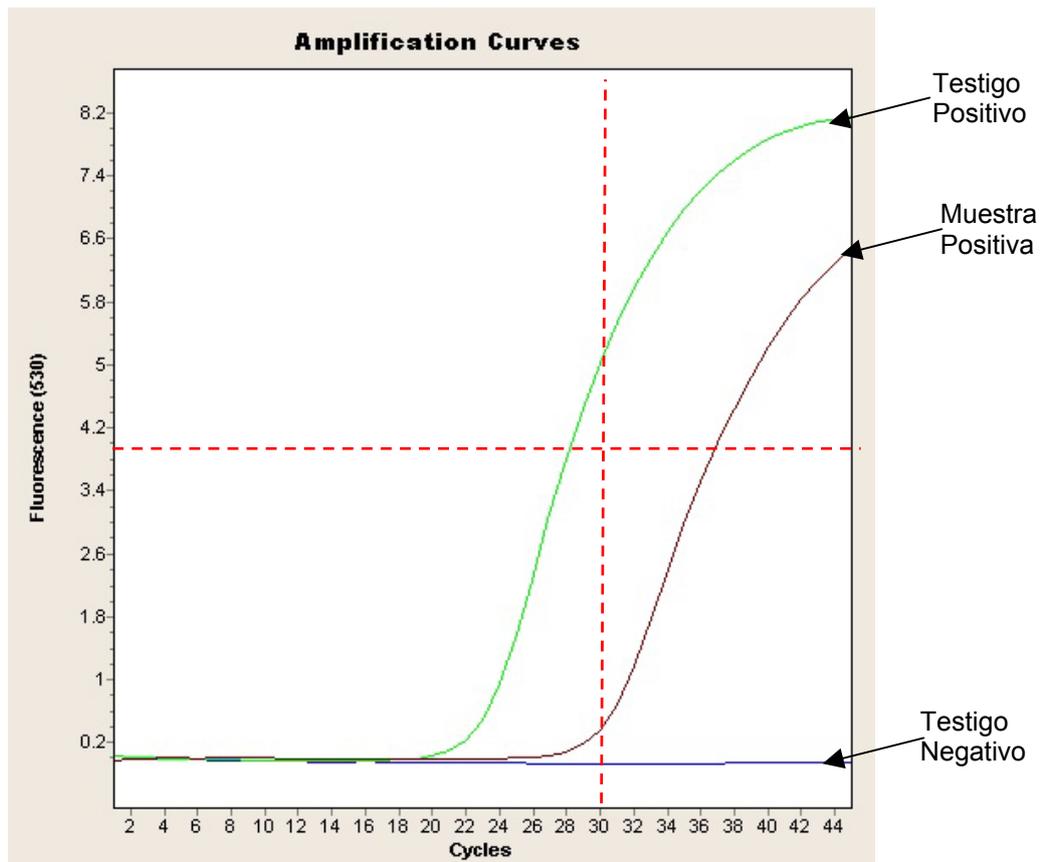


Figura 10. Gráfica de adquisición de fluorescencia de muestras positivas. La línea verde claro muestra el testigo positivo, la línea morada muestra una muestra positiva y la línea azul el testigo negativo.

Se obtuvieron 15 muestras positivas al gen matriz del virus de Influenza tipo A y una muestra positiva para el subtipo H5 (Tabla 7).

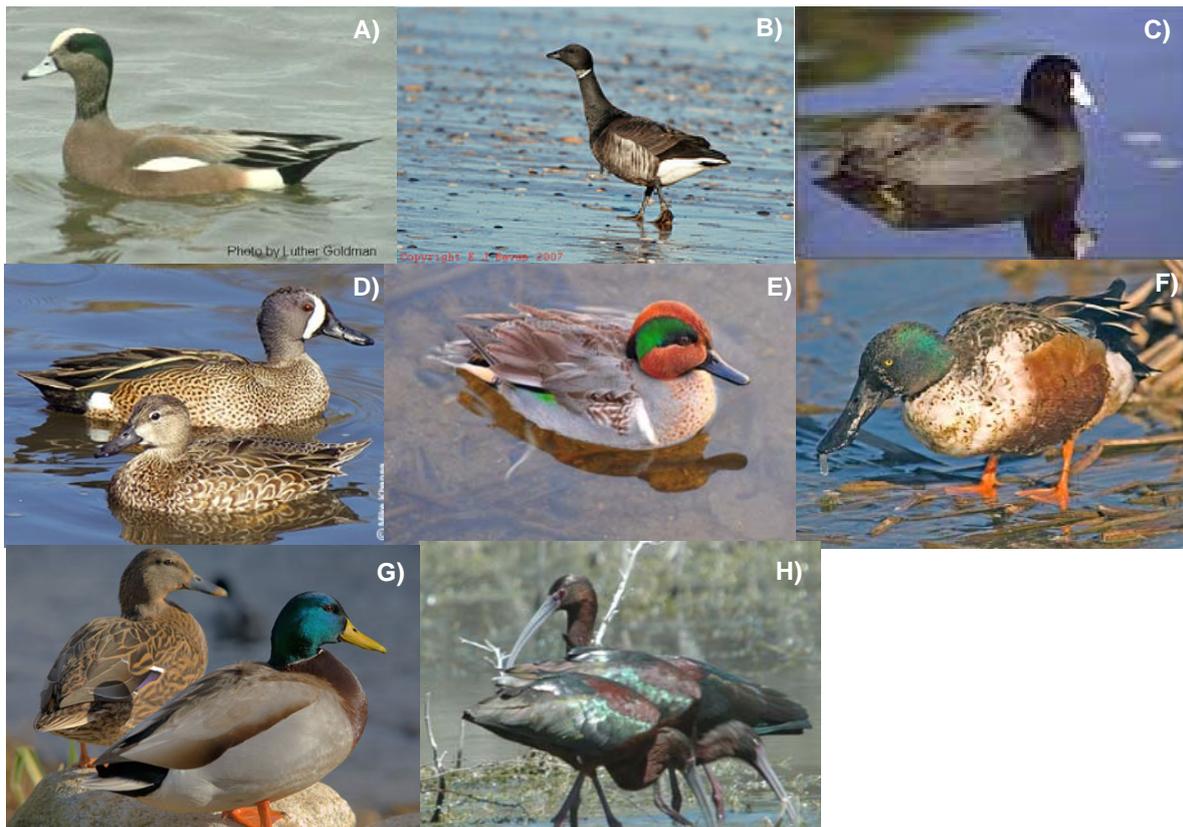
Tabla 7. Relación de muestras positivas a influenza tipo A.

Especie	Humedal	Estado	RT-PCR tiempo real		
			Matrix	H5	H7
<i>Anas crecca carolinensis</i>	Navachiste	Sinaloa	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Anas clypeata</i>	Navachiste	Sinaloa	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Anas discors</i>	Navachiste	Sinaloa	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Anas crecca carolinensis</i>	Bahía Santa María	Sinaloa	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Anas crecca carolinensis</i>	Bahía Santa María	Sinaloa	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Branta bernicla</i>	Bahía Santa Bárbara	Sonora	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Plegadis chihi</i>	Delta del Río Colorado	Sonora	Positivo	Negativo	Negativo

Tabla 7. Continuación

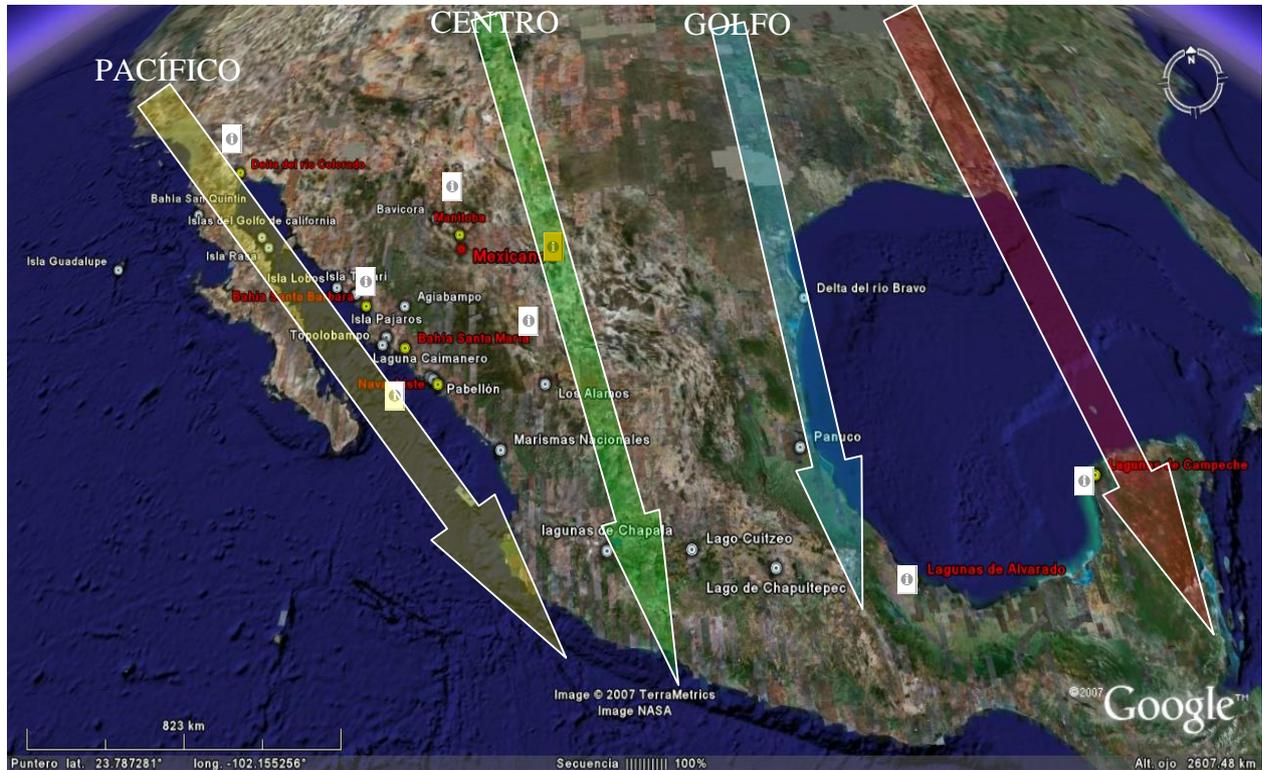
Especie	Humedal	Estado	RT-PCR tiempo real		
			Matrix	H5	H7
<i>Anas platyrhynchos</i>	Mexicanos	Chihuahua	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Anas platyrhynchos</i>	Mexicanos	Chihuahua	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Anas platyrhynchos</i>	Mexicanos	Chihuahua	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Anas clypeata</i>	Mexicanos	Chihuahua	Positivo	Negativo	Negativo
<b><i>Anas americana</i></b>	<b>Mexicanos</b>	<b>Chihuahua</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
<i>Anas platyrhynchos</i>	Manitoba	Chihuahua	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Fulica americana</i>	Lagunas de Campeche	Yucatán	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Anas discors</i>	Lagunas de Alvarado	Veracruz	Positivo	Negativo	Negativo

Se encontraron 8 especies positivas para el gen Matrix de influenza tipo A y una especie positiva *Anas americana* para el subtipo H5, las imágenes de las especies positivas se pueden observar en la figura 11.



**Figura 11. Aves positivas al virus de Influenza tipo A.** A) *Anas americana*. (POSITIVA al subtipo H5) B) *Branta bernicla*. C) *Fulica americana*. D) *Anas discors*. E) *Anas crecca carolinensis*. F) *Anas clypeata*. G) *Anas platyrhynchos*. H) *Plegadis chihi*

Las muestras positivas se encuentran distribuidas en 8 humedales prioritarios y se encuentran en las cuatro diferentes rutas migratorias, encontrándose un mayor número de muestras positivas en los humedales de las rutas del centro y pacífico (Figura 12).



**Figura 12. Distribución de las muestras positivas en los humedales.** En el mapa se muestran los humedales donde se encontraron muestras positivas al gen matriz de influenza tipo A (íconos blancos) y el humedal donde se encontró la muestra positiva al subtipo H5 (ícono e rojo).

### III.I DISCUSIÓN.

La presencia del virus de influenza aviar cobro importancia a partir del año 1918 cuando el subtipo H1N1 origina daño a la humanidad causando más de 50 millones de muertes en todo el mundo, en 1957 y 1968 los subtipos H2N2 y H3N2 son el origen de dos pandemias más que producen 10 millones de muertes y debido a que a partir de 1997 se detecta que un el subtipo H5N1 es el responsable de la muerte de un niño en Hong Kong y que a la fecha se tiene el registro de que ha causado la muerte a 248 personas más (URL 2) y sabiendo que este nuevo subtipo de virus es capaz de distribuirse alrededor del planeta por diversas vías provocando daño tanto a humanos como a aves, nuestro grupo de trabajo destacó la importancia de realizar un monitoreo para, detectar la presencia de este virus en aves de vida silvestre cubriendo las principales rutas migratorias que atraviesan nuestro país.

Se seleccionó utilizar la técnica de RT-PCR en tiempo real para detectar la presencia del virus, ya que al estar colaborando en el Plan estratégico entre agencias de EE UU en el Sistema de detección temprana de influenza aviari altamente patogénica H5N1 asiática en aves migratorias silvestres, los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios (NVSL) determinaron que esta prueba es la más adecuada para detectar la presencia del virus y de acuerdo a estudios publicados para la detección primaria de influenza aviar (Cattoli *et al.* 2004; Spackman *et al.* 2002) esta presenta los valores más altos de sensibilidad y especificidad para su detección; y debido a la importancia de obtener resultados de forma rápida y segura para poder realizar las acciones necesaria para prevenir el brote de esta enfermedad, esta técnica resulta ser la más adecuada para cumplir con las metas establecidas por las agencias que colaboran en este importante plan. Las aves silvestres, especialmente las acuáticas, son hospederos naturales de los virus de influenza aviar y se sabe que juegan un papel importante en la epizootiología de dichos virus. Todos los subtipos de hemaglutinina y neuraminidasa han sido encontrados en aves acuáticas y costeras (Webster *et al.* 1992, Krauss *et al.* 2004, Widjaja *et al.* 2004). Por lo tanto es importante realizar el monitoreo de influenza aviar en este tipo de aves en sus principales sitios de agrupamiento como lo son los humedales.

La selección de los humedales a estudiar se basó en los datos proporcionados por la organización Ducks Unlimited de México ya que a través del análisis de la información generada por el Servicio de Pesca y Vida Silvestre de los Estados Unidos (U.S. Fish and Wild Life Service) en los conteos de medio invierno en nuestro país, se han identificado 28 humedales prioritarios en los cuales se albergan al 84% del total de las aves acuáticas que invernán en México ([www.dumac.org](http://www.dumac.org)). El mapa de los humedales monitoreados (Figura 9) se realizó mediante el uso de sistemas de geoposicionamiento, por lo tanto los puntos en el mapa están basados en las coordenadas (UTM) de cada uno de los lugares donde se colectaron muestras, con lo que se podrían seguir realizando monitoreos exactamente en los mismos lugares para determinar prevalencia del virus.

Se determinó colectar muestras de hisopados traqueales y cloacales y trabajarlas de forma independiente, ya que se ha reportado que la principal zona de replicación del virus en aves es el tracto digestivo, por lo tanto al colectar una buena muestra de hisopado cloacal y siguiendo los protocolos establecidos se puede detectar la presencia del virus, sin embargo con los nuevos brotes del subtipo H5N1 de alta patogenicidad, se ha detectado que este subtipo también se replica en las células del tracto respiratorio, por lo tanto cobra mucho interés el colectar y trabajar de forma independiente las muestras obtenidas de hisopados de zona traqueal (Webster *et al.* 2006).

Las muestras analizadas corresponden en más del 85% a aves acuáticas y aves playeras (Sibley D., 2000), con lo cual el estudio abarca a las principales especies de aves susceptibles a este virus, tal como se ha establecido en estudios previos de esta enfermedad (Winker K. *et al.*, 2007), al obtener muestras de aves que realizan migración desde zonas de Alaska, tales como gansos, brantas y patos. Estas muestras se tornan de mucho interés, ya que estas aves se encuentran en convivencia con aves que utilizan rutas migratorias transcontinentales como la Austral-asiática en donde, se podrían encontrar y convivir con aves que hayan estado en contacto con el o los virus circulantes en las aves del continente Asiático y ya que en esta zona es en donde se presentaron los primeros casos de influenza aviar en humanos y aves por el subtipo H5N1 (Webster *et al.* 2006, Normile *et al.* 2006), esta podría ser una importante y poco visualizada vía de entrada del virus al

país. Los humedales seleccionados se encuentran distribuidos por todo el país cubriendo las cuatro rutas migratorias principales de Norte América (Figura 13) siendo estas: Pacífico, Centro, Golfo y Atlántico (Sibley, 2000).

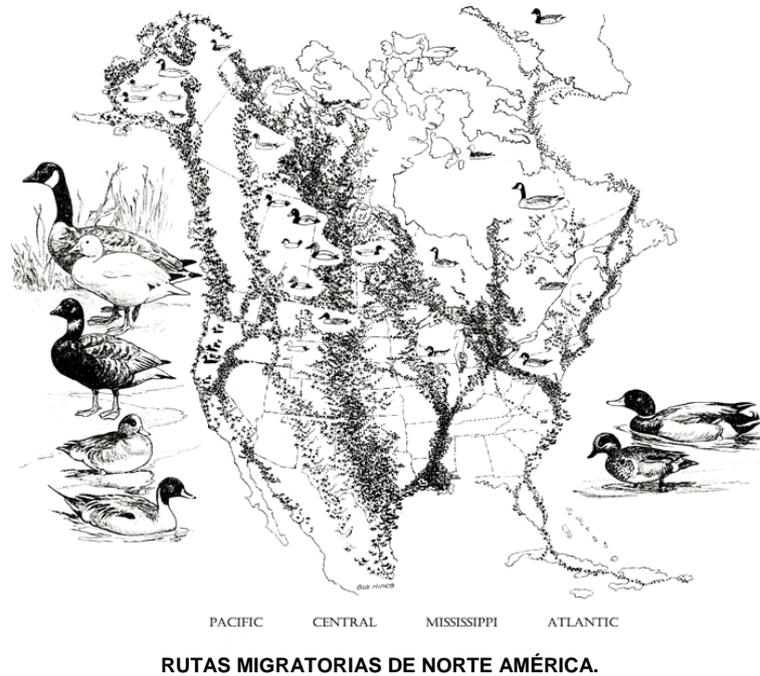


Figura 13. Rutas Migratorias de Norte América. En la figura se puede observar esquemáticamente las cuatro rutas que cubren el país, cambiando la Ruta del Mississippi por la del Golfo en nuestro país.

La importancia de analizar muestras de aves silvestres para detectar el virus de influenza aviar, resulta ser importante ya que además de ser aves que pueden recorrer miles de kilómetros en una semana y de realizar migraciones transcontinentales, en algunos sitios cuando se encuentran reunidas para alimentarse o para anidar, estas pueden estar en estrecho contacto entre miles de ellas y bajo condiciones severas de estrés emulando las condiciones de las aves de corral en donde se han presentado brotes de Influenza Aviar por el subtipo H5N1 de alta patogenicidad, dando como resultado mortandades masivas de esta. Tal es el caso de las gaviotas ploma (*Larus heermanni*) y el charran elegante (*Sterna caspia*) que se reúnen en la isla Rasa en el Golfo de California en condiciones de temperatura mayores a los 40° C y agrupaciones masivas en áreas menores a 1Km<sup>2</sup> (Figura 14).



Figura 14. Agrupación de aves. A) Colonia de gaviotas pluma y charran elegante en la Isla Rasa México. B) Granjas tecnificadas para aprovechamiento de aves de corral.

Durante el procesamiento de las muestras se obtuvieron varias gráficas de RT-PCR en tiempo real en donde la adquisición de fluorescencia inicia su aumento antes del ciclo 30 pero estas no alcanzaron a aumentar en cuatro unidades para considerarse como muestras positivas según el protocolo de los NVSL, ya que presentaban una adquisición de fluorescencia menor a cuatro unidades y el aumento en la fluorescencia no iniciaba antes ; sin embargo cuando se realizó la extracción de RNA de cada una de las muestras que formaban la mezcla de trabajo se encontró que algunas de estas alcanzaban valores de fluorescencia mayores a cuatro; un ejemplo de estos casos se muestra en la figura 15. En este ejemplo el análisis en la mezcla de trabajo presentó un incremento de dos unidades en la fluorescencia sin embargo cuando se analizaron individualmente las muestras que lo componen, se encontró que una de las muestras que integraban la mezcla de trabajo presento un incremento de cinco unidades en la fluorescencia. Debido a estos resultados se decidió considerar como mezclas positivas sospechosas a todas aquellas que presentaran aumento en la fluorescencia mayor o igual a uno; las cuales se analizaron individualmente las muestras para comprobar si es que son positivas.

El porcentaje de muestras positivas para el virus de Influenza tipo A, se encuentran cercanos a los reportados en otros estudios (Olsen *et al*, 2006), ya que se han reportado que en poblaciones de Norte América y Canadá los valores encontrados para las poblaciones invernales de patos y gansos (Familia: *Anatidae*) se encuentran en un rango de 0.25 – 2.0 % y los valores obtenidos en este estudio fueron 13 muestras positivas de 2796 muestras de patos y gansos, obteniendo un valor de 0.46% de muestras positivas al virus de influenza tipo A. Las muestras positivas provienen de 7 de los 28 humedales estudiados y se detectaron siete muestras positivas provenientes de la ruta del Pacífico, seis de la ruta del Centro, una de la ruta del Golfo y una de la ruta del Atlántico. Las rutas del Pacífico y Centro son las que presentan un mayor número de muestras positivas siendo estas rutas las que mayor utilización tienen por las aves que recorren durante su migración desde Alaska hasta Sur- América. En la ruta del Centro se encuentra la muestra positiva al subtipo H5 de Influenza A, que pertenece a la especie *Anas americana* la cual se distribuye por todo el pacífico desde el norte de Canadá hasta México en las estaciones invernales y una residencia en Alaska durante la primavera (Sibley 200, URL 1). Esta muestra positiva al subtipo H5 también se analizó para buscar si pertenecía al subtipo N1 mediante el uso de los protocolos de la OMS; se determinó que no es del subtipo N1 (datos no publicados del Laboratorio de Medicina de Conservación, ESM-IPN),este hallazgo se torna de mucho interés ya que hasta la fecha en el país no se había reportado la presencia de este subtipo de virus en aves silvestres y aunado al interés mundial por conocer los subtipos presentes en cada uno de los países, con el fin de actuar de la mejor manera ante cualquier brote de esta enfermedad, estos resultados pueden ser la base de estudios posteriores para identificación de origen y distribución del virus en América.

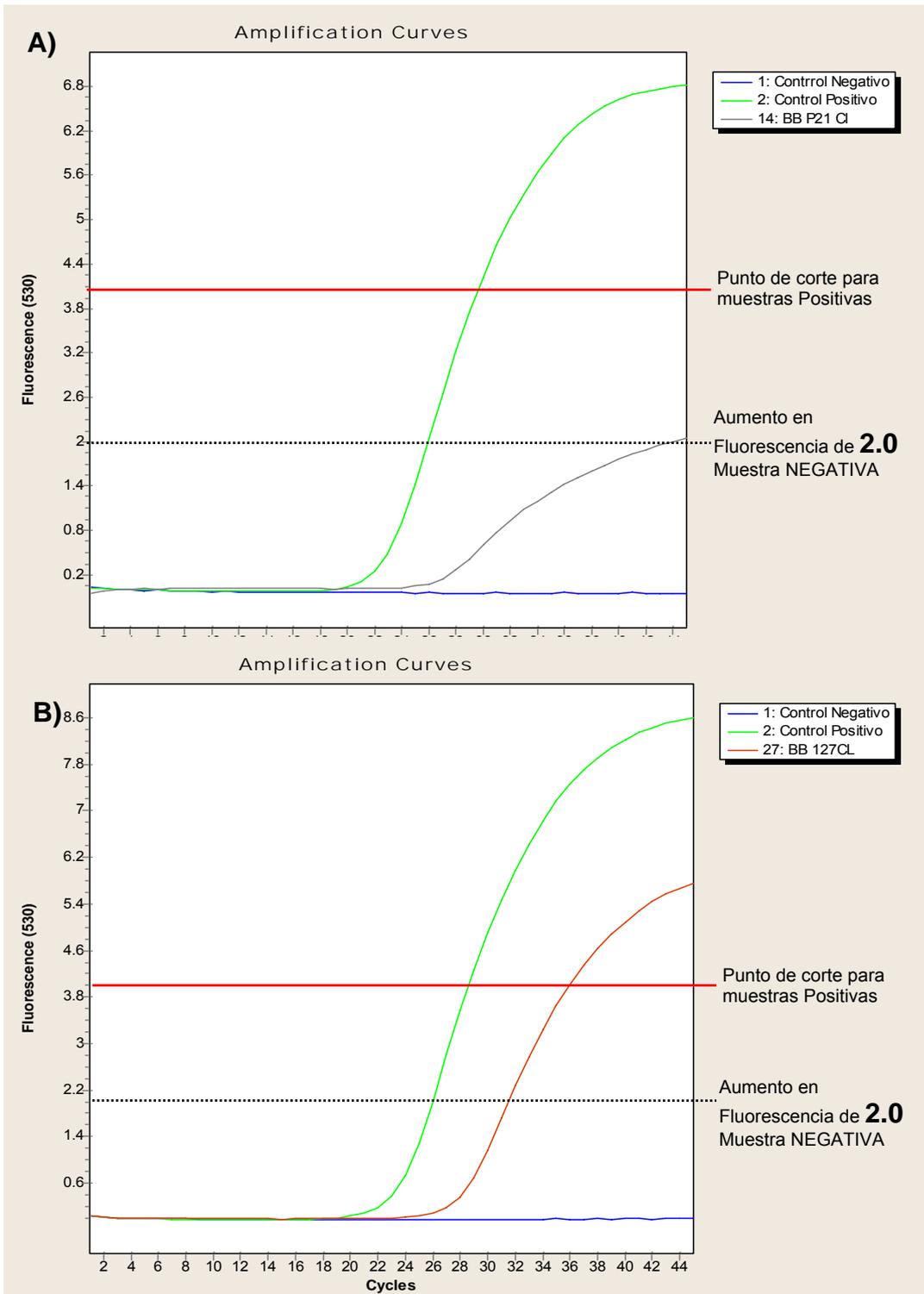


Figura 15. Gráficas de adquisición de fluorescencia de una muestra sospechosa. (A) Gráfica de la muestra de trabajo. (B) Gráfica de la muestra individual que forma parte de la muestra de trabajo.

## VII. CONCLUSIONES

- Se detectó la presencia del virus de influenza aviar en siete de los 28 humedales monitoreados.
- Las muestras positivas provenían de sitios ubicados en las cuatro rutas migratorias que pasan por la República Mexicana.
- Se encontró que las muestras de trabajo que presentan aumento en fluorescencia con valores menores a cuatro podrían generar falsos negativos si se sigue el criterio establecido de los NVSL.
- Se detectó la presencia del subtipo H5 de influenza aviar en una muestra en uno de los humedales monitoreados; este virus no pertenece al subtipo N1.
- El trabajar de manera independiente con muestras de traquea y cloaca nos ayuda de forma indirecta a saber si el virus presente es de alta o baja patogenicidad.
- El trabajar con mezclas de trabajo, puede generar interferencias por presencia de inhibidores por lo tanto sería mejor trabajar con muestras individuales.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Belshe R., 2005, The Origins of Pandemic influenza – Lessons from the 1918 Virus, *N. England J. Med*, 353;21.

Cattoli G., Drago A., Maniero S., Toffan A., Bertoli E., Fascina S., Terregino C., Robbi C., Vicenzoni G. and Capua I. 2004. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathology* 33: 432 – 437.

Chen H., Smith G., Zhang S., Qin K., Wang J., Li K., Webster., Peiris., Guan Y. 2005. Avian Flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 436: 191–192.

García-García J. and Ramos C. 2006. La influenza una pandemia vigente de salud pública. *Salud pública Méx.* 48:3

Fouchier R., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan., Olsen B., Osterhaus A. 2005, Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *Journal of Virology* 79: 2814 – 2822.

Hatta M., Gao P., Halfmann P., Kawaoka Y., 2001, Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A viruses, *Science* 293: 1840 – 1843.

Hilleman M. R., 2002, Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 20: 3068 – 3087.

Horimoto T., and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:129-141.

Kawaoka Y. and Webster R., 1988, Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 85: 324 – 328.

Lee C., Senne D., Linares A. Spackman E., Suarez D. 2003, Characterization of recent H5 subtype avian influenza viruses from US poultry, *Avian Pathology*, 33: 288– 297.

Ligon B. L. 2005. Avian Influenza virus H5N1: A Review of its History and Information Regarding its potential to cause the next Pandemic. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 16: 326 – 335

Liu J., Xiao H., Lei F., Zhu Q., Qin K., Zhang X., Zhao D., Wang G., Feng Y., Ma J., Liu W., Wang J., Gao G. 2005. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*.

Manual U.S. Interagency Strategic Plan. An Early Detection System for Highly Pathogenic H5N1, Avian Influenza in Wild Migratory Birds.

Munster V., Wallensten A., Fourchier R. 2005, Mallards and Highly Pathogenic Avian Influenza Ancestral Viruses, Northern Europe, *Emerging Infectious Diseases*, 11: 10, 1545 – 1551.

Normile D., 2006, Avian Influenza: Evidence Points to Migratory Birds in H5N1 spread, *Science* 311: 1225.

Olsen B., Munster V., Wallenston A., Walldenstrom J., Osterhaus A., and Fouchier R. 2006. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science* 312: 384 – 388.

Payungporn S., Chutinimitkul S., Chaisingh A., Damrongwantanapokin S., Nuansrichay B., Pinyochon W., Amonsin A., Donis R., Theamboonlers A., Poovorawan Y. 2006, Discrimination between Highly Pathogenic and Low Pathogenic H5 Avian Influenza A Viruses, *Emerging Infectious Diseases*, 12: 700 – 701.

Senne D., Panigrahy B., Kawaoka Y., Pearson J., Süß J., Lipkind M., Kida H., Webster R., 1996, Survey of the Hemagglutinin (HA) Cleavage Site Sequence of H5 and H7 Avian Influenza Viruses: Amino Acid Sequence at the HA Cleavage Site as a Marker of Pathogenicity Potential, *Avian Diseases*, 40: 425-437.

Sibley David Allen, *The Sibley Guide to Birds*, 2000, National Audubon Society, Ed. Knopf.

Spackman E., Senne D., Myers T., Bulaga L., Garber L., Perdue M., Lohman K., Daum L., Suarez D. 2002, Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes, *Journal of clinical microbiology*, p. 3256–3260

Subbarao K., Klimov A., Swayne D., Cox N., 1998, Characterization of Avian Influenza A (H5N1) Virus Isolated from a child with a Fatal Respiratory Illness, *Science*, 279: 393 – 396.

Suarez D., Senne D., Banks J., Brown I., Alexander D., 2004, Recombination Resulting in Virulence Shift in Avian Influenza Outbreak, Chile. *Emerging Infectious Diseases*, 10:4, 693 – 699.

Webster G., Guan Y., Peris M. and Chen H. 2006. H5N1 Influenza Continues To Circulate and Change. *Microbe* 12: 559 – 565.

Webster R., Bean W., Gorman O., Chambers T. and Kawaoka Y. 1992. Evolution and Ecology of Influenza A viruses. *Microbiol. Reviews* 56:152 – 179

Winker K., McCracken K., Gibson D., Suárez D., Swayne D., 2007, Movements of birds and Avian Influenza from Asia into Alaska, *Emerging Infectious Diseases* 13: 547 – 555.

### **Consultas URL**

Ducks Unlimited. [www.dumac.org](http://www.dumac.org)

OMS. Boletín de información de cronología de Influenza Aviar disponible en: [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/Timeline\\_24%2002.pdf](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/Timeline_24%2002.pdf)

OMS. Boletín de información sobre preguntas frecuentes. Disponible en: [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/avian\\_faqs/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/avian_faqs/en/index.html)

CDC Boletín de información general. Disponible en: <http://www.pandemicflu.gov>

Avian Influenza portal disponible en: <http://influenza.bvsalud.org>

Avibase. [www.avibase.com](http://www.avibase.com)

Manual Cultek para RT-PCR en tiempo real.